

SÉRIE A, N° 1818

N° D'ORDRE

2684

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

JEAN COURTOIS

PHARMACIEN DES HOPITAUX DE PARIS,
ASSISTANT A LA FACULTÉ DE PHARMACIE.

1^{re} Thèse : **Recherches sur les phosphatases végétales.**
Contribution à l'étude de « l'affinité » d'une diastase
vis à vis de substrats différents.

2^{me} Thèse : **Propositions données par la Faculté.**

Soutenues le 1938, devant la Commission d'examen

1 - 4 JUIL. 1938

Président : MM. M. JAVILLIER,

Examineurs : { E. DARMOIS,
AUBEL.

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

1938

SÉRIE A, N° 1818

N° D'ORDRE

2684

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES PHYSIQUES

PAR

JEAN COURTOIS

PHARMACIEN DES HOPITAUX DE PARIS,
ASSISTANT A LA FACULTÉ DE PHARMACIE.

1^{re} Thèse : **Recherches sur les phosphatases végétales.**
Contribution à l'étude de « l'affinité » d'une diastase
vis à vis de substrats différents.

2^{me} Thèse : **Propositions données par la Faculté.**

Soutenues le

1938, devant la Commission d'examen

Président : MM. M. JAVILLIER,

Examineurs : { E. DARMOIS,
AUBEL.

LONS-LE-SAUNIER

IMPRIMERIE ET LITHOGRAPHIE MAURICE DECLUME

1938

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire..... M. MOLLIARD.

Doyen..... C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du Globe.

<i>Professeurs honoraires.</i>	H. LEBESGUE.	BLAISE.	G BERTRAND.
	A. FERNBACH.	DANGEARD.	ABRAHAM.
	EMILE PICARD.	LESPIEAU.	Ch. FABRY.
	LÉON BRILLOUIN.	MARCHIS.	LÉON BERTRAND.
	GUILLET.	VESSIOT.	WINTREBERT.
	PÉCHARD.	PORTIER.	DUBOSCQ.
	FREUNDLER.	MOLLIARD.	BOHN.
	AUGER.	LAPICQUE.	

PROFESSEURS

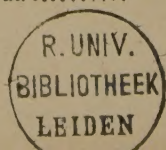
M. CAULLERY.....	T Zoologie (Evolution des êtres organisés).	FOCH	Mécanique expérimentale des fluides.
G. URBAIN	T Chimie générale.	PAUTHENIER.....	Physique (P.C.B.).
Emile BOREL.....	T Calcul des probabilités et Physique mathém.	DE BROGLIE.....	T Théories physiques.
Jean PERRIN.	T Chimie physique.	CHRÉTIEN.....	Optique appliquée.
E. CARTAN	T Géométrie supérieure.	P. JOB.....	Chimie générale.
A. COTTON.....	T Recherches physiques.	LABROUSTE.....	Physique du Globe.
J. DRACH.....	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	PRENANT.....	T Anatomie et Histologie comparées.
Charles PÉREZ.. .	T Zoologie.	VILLEY.	Mécanique physique et expérimentale.
E. RABAUD	T Biologie expérimentale	COMBES.....	T Physiologie végétale.
M. GUICHARD	Chimie minérale.	GARNIER.....	T Mathématiques générales.
Paul MONTEL.....	T Théorie des fonctions et Théorie des transformations.	PÉRÈS	Mécanique théorique des fluides.
L. BLARINGHEM ..	T Botanique.	HACKSPILL.....	Chimie (P.C.B.).
G. JULIA	T Mécanique analytique et Mécanique céleste.	LAUGIER.....	T Physiologie générale.
C. MAUGUIN.....	T Minéralogie.	TOUSSAINT.....	Technique Aéronautique.
A. MICHEL-LÉVY..	T Pétrographie.	M. CURIE.....	Physique (P.C.B.).
H. BÉNARD	T Mécanique expérimentale des fluides.	G. RIBAUD	T Hautes températures.
A. DENJOY.....	T Application de l'analyse à la Géométrie.	CHAZY.....	T Mécanique rationnelle.
L. LUTAUD.....	T Géographie physique et géologie dynamique.	GAULT.....	Chimie (P.C.B.).
Eugène BLOCH.....	T Physique.	CROZE.....	Recherches Physiques.
G BRUHAT.....	T Physique théorique et physique céleste.	DUPONT.....	T Théories chimiques.
E. DARMOIS.....	T Enseignement de Physique.	LANQUINE	T Géologie structurale et géologie appliquée.
A. DEBIERNE.....	T Physique Générale et Radioactivité.	VALIRON.....	Mathématiques générales.
A. DUFOUR.....	T Physique (P.C.B.).	BARRABÉ.....	Géologie structurale et géologie appliquée.
L. DUNOYER.....	Optique appliquée.	MILLOT.....	Biologie animale (P. C. B.)
A. GUILLIERMOND.	T Botanique.	F PERRIN.....	Théories physiques.
M. JAVILLIER.....	T Chimie biologique.	VAVON.....	Chimie organique.
L. JOLEAUD	Paléontologie.	G. DARMOIS	Calcul des probabilités et Physique mathém.
ROBERT LÉVY.....	T Physiologie comparée.	CHATTON.....	T Biologie maritime.
F. PICARD	Zoologie (Evolution des êtres organisés).	AUBEL.....	Chimie biologique.
Henri VILLAT.....	T Mécanique des fluides et applications.	Jacques BOURCART.	Géographie physique et Géologie dynamique.
Ch JACOB.....	T Géologie.	M ^{me} JOLIOT-CURIE..	Physique générale et Radioactivité.
P. PASCAL.....	T Chimie minérale.	PLANTEFOL.....	Biologie végét. (P.C.B.)
M. FRÉCHET.....	T Calcul différentiel et Calcul intégral.	CABANNES	Enseignement de Physique.
E. ESCLANGON.....	T Astronomie.	GRASSÉ	Biologie anim. (P.C.B.)
M ^{me} RAMART-LUCAS.	T Chimie organique.	PRÉVOST.....	Chimie (P.C.B.).
H. BÉGHIN	T Mécanique physique et expérimentale.		

Secrétaire.....

A. PACAUD

Secrétaire honoraire.....

D. TOMBECK



A MONSIEUR LE PROFESSEUR M. JAVILLIER,

MEMBRE DE L'INSTITUT,
PROFESSEUR A LA FACULTÉ DES SCIENCES
ET AU CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET MÉTIERS.

Respectueux hommage.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR H. HÉRISSEY,

PROFESSEUR A LA FACULTÉ DE PHARMACIE,
PHARMACIEN DES HOPITAUX DE PARIS.

Hommage de respectueuse gratitude.

A MON MAITRE

MONSIEUR LE PROFESSEUR PAUL FLEURY,

MAITRE DE CONFÉRENCES A LA FACULTÉ DE PHARMACIE,
PHARMACIEN-CHEF DES ASILES DE LA SEINE.

En témoignage de profonde reconnaissance.

A MA FEMME.

A MA FILLE.

A MES PARENTS.

A MES AMIS.

INTRODUCTION.

Le nombre des composés phosphorés isolés à partir des êtres vivants n'a fait que s'accroître au cours de ces dernières années. Ces dérivés interviennent dans la plupart des processus physiologiques essentiels : contraction musculaire, oxydo-réductions biologiques etc. Les composés phosphorés biologiques libèrent de l'acide phosphorique sous l'action d'un certain nombre de diastases : les *phosphatases*. Il semble exister plusieurs groupes de phosphatases à spécificités différentes dont le plus important est celui des *phosphomonoestérases* qui hydrolysent les monoesters orthophosphoriques ; parmi ces substrats le β glycérophosphate est le plus couramment utilisé. Le plus souvent les phosphatases hydrolysent à des vitesses différentes le β glycérophosphate et son isomère α . Ces différences ont conduit certains auteurs à admettre l'existence d' α glycérophosphatases spécifiques différentes des β glycérophosphatases ; d'autres enzymologistes considèrent au contraire qu'il n'existe qu'une seule glycérophosphatase non spécifique.

Dans ce travail nous nous sommes proposé d'apporter notre contribution à la solution de ce problème. En étudiant les principaux caractères des phosphatases végétales nous avons comparé leur action sur les deux glycérophosphates. Ces recherches nous ont amené à conclure que tout se passait comme s'il n'existait qu'une seule glycérophosphatase apte à hydrolyser les deux isomères — les vitesses d'hydrolyse différentes observées dans certains cas peuvent être interprétées par des stabilités et vitesses de décomposition inégales de la combinaison diastase-substrat.

Dans la première partie de ce travail nous résumerons brièvement les principaux caractères des phosphatases en développant plus spécialement les caractéristiques sur lesquelles ont porté nos recherches. Nous exposerons

également l'état actuel du problème de la combinaison diastase-substrat et de sa dissociation ; enfin nous y ajouterons la description des techniques analytiques utilisées au cours de notre travail. La seconde partie de cet exposé est consacrée à l'étude de la glycérphosphatase de la taka-diastrase de l'*Aspergillus orizae*.

La troisième partie étudie les glycérphosphatases des graines, particulièrement celles de la Moutarde blanche et de l'Amandier. Comme d'autres diastases, les phosphatases peuvent synthétiser les corps qu'elles sont susceptibles d'hydrolyser ; nous avons comparé les synthèses biochimiques des glycérphosphates catalysées soit par une phosphatase animale (rein) soit pas une phosphatase végétale (Amandier).

Nous exprimons notre respectueuse gratitude à M. le Professeur JAVILLIER qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse ; nous adressons également tous nos remerciements à Messieurs les Professeurs E. DARMOIS et AUBEL qui ont bien voulu accepter de faire partie de notre jury de thèse.

Notre travail a été réalisé en grande partie au laboratoire de Chimie biologique de la Faculté de Pharmacie ; nous exprimons à M. le Professeur H. HÉRISSEY notre respectueuse gratitude pour l'accueil qu'il nous y a réservé et tout l'intérêt qu'il n'a cessé de nous porter.

Après nous avoir initié à la recherche scientifique notre maître P. FLEURY nous a orienté vers ces recherches sur les phosphatases. Dans ce travail où nous avons eu à associer la Chimie analytique et l'Enzymologie, la grande expérience de M. FLEURY dans ces deux domaines, ses conseils éclairés et judicieux, nous ont été extrêmement précieux. Nous sommes heureux d'exprimer à ce maître bienveillant qui ne nous a ménagé ni son temps, ni sa peine, tout notre déférent et profond attachement.

Nous adressons à notre ami G. POIROT, assistant de la chaire de Chimie biologique, nos vifs remerciements pour sa constante amabilité à notre égard.

PLAN DU TRAVAIL.

INTRODUCTION.

PREMIÈRE PARTIE. — Généralités.

Chapitre I. — Les phosphatases.

Chapitre II. — La combinaison diastase-substrat.

Chapitre III. — Techniques analytiques.

DEUXIÈME PARTIE. — Etude de la taka-diaстase.

TROISIÈME PARTIE. — Etude des phosphatases de graines.

Chapitre I. — Phosphatases hydrolysant plus rapidement le β -glycérophosphate que l' α .

Chapitre II. — Phosphatases hydrolysant les deux glycérophosphates à des vitesses égales.

Chapitre III. — Essais de purification et fractionnement de la phosphatase d'Amande.

QUATRIÈME PARTIE. — Recherches sur la synthèse biochimique des glycérophosphates.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

BIBLIOGRAPHIE.

TABLE DES MATIÈRES.

PREMIÈRE PARTIE.

Généralités.

CHAPITRE PREMIER.

LES PHOSPHATASES.

Les phosphatases sont les diastases qui libèrent de l'acide orthophosphorique à partir de dérivés phosphorés organiques ou minéraux.

SUZUKI, YOSHIMURA et TAKAISHI [83], en 1907, signalèrent les premiers que certaines céréales libéraient de l'acide phosphorique à partir de la phytine. Depuis cette époque plus de cinq cents publications (1) ont eu pour objet l'étude des phosphatases.

Répartition des phosphatases.

Les phosphatases sont extrêmement répandues chez les êtres vivants : microorganismes, champignons, végétaux supérieurs, animaux des branches les plus diverses de la classification. Cette extraordinaire diversité de répartition permet de dresser facilement la courte liste des tissus où la phosphatase n'a pu être décelée : aorte, gan-

(1) Afin de ne pas développer exagérément la bibliographie de cette mise au point nous renverrons le plus souvent possible à la revue générale très complète de FOLLEY et KAY : Les Phosphatases [83]. Nous ne donnerons une bibliographie détaillée que dans les chapitres que nous développons spécialement et où nous relatons les résultats obtenus par d'autres auteurs dans un domaine voisin de celui de nos expériences,

glions lymphatiques normaux, cartilage hyalin, peau de Chien [83]. Chez les Mammifères, la muqueuse intestinale, le rein [83], le placenta REIS [180], la prostate KUTSCHER et WÖRNER [144] présentent une forte activité phosphatasique ; par contre les muscles, le sang, les artères, les cartilages ossifiés sont relativement pauvres en phosphatase.

Les principaux organes des végétaux supérieurs : feuille, tubercule et surtout la graine possèdent une forte activité phosphatasique ; les tubercules de Pomme de terre entre autres sont très actifs, PFANKUCH [173]. Cette teneur en phosphatase d'un tissu végétal subit des variations au cours du développement [83].

Classification des phosphatases.

Le terme général de phosphatases s'applique à toute une classe de diastases différentes et de spécificités diverses. FOLLEY et KAY [83] distinguent plusieurs groupes de phosphatases dont chacun peut comporter plusieurs types.

On distingue donc à l'heure actuelle :

a) les *phosphomonoestérases* qui hydrolysent les monoesters de l'acide orthophosphorique et en particulier les glycérophosphates. Certains auteurs ont vu dans l'hydrolyse des nucléotides l'intervention de monoestérases à spécificité plus étroite : les *nucléotidases*. Il en serait vraisemblablement de même pour les esters diphosphoriques d'hexoses qui exigeraient des *hexosediphosphatases* spécifiques.

Notre travail a été réalisé avec les phosphomonoestérases végétales ; nous développons donc plus spécialement leurs caractères dans la suite de cet exposé.

b) les *phosphodiesterases* n'hydrolyseraient qu'une des deux liaisons ester des diesters orthophosphoriques simples ou mixtes. Les phosphodiesterases sont en général associées aux monoestérases et dédoublent lentement les

diesters. Cependant, selon UZAWA [83], le venin de certains serpents serait susceptible de transformer le diphénylphosphate en monophénylphosphate non hydrolysé.

Les recherches effectuées dans le but de séparer d'autres phosphodiesterases privées de monoesterases ont abouti à des résultats contradictoires. Il est par contre possible d'obtenir des monoesterases privées de diesterases à partir du rein ou de la trame conjonctive hépatique, ROCHE et Mlle LATREILLE [186]. On n'a pu encore déceler l'existence d'une triesterase. La taka-diastrase qui contient de nombreuses phosphatases est sans action sur les triesters : triméthyl et triphényl-phosphates, NEUBERG et JACOBSON [164] ; triamylphosphate, FALKENHAUSEN [72].

c) les *pyrophosphatases* mettent en liberté de l'acide orthophosphorique soit à partir des pyrophosphates métalliques, soit à partir des esters pyrophosphoriques. Il est à peu près universellement admis que les pyrophosphatases sont distinctes des phosphomonoesterases. TAKAHASHI [83] distingue même trois types de pyrophosphatases : la première, de pH optimum 3,5, a été isolée de l'autolysat de rein et se montre inactive sur les mono- et di-esters orthophosphoriques ; le rein contient une seconde pyrophosphatase de pH optimum 9,0, enfin un troisième type de pH optimum 5,6 se trouve dans le son de Riz. Ce dernier type, à la différence des précédents, n'a pu être séparé des autres phosphatases associées.

E. BAUER [24, 25] a différencié la pyrophosphatase et la glycérphosphatase de levure d'après leurs vitesses d'inactivation différentes en fonction soit du pH soit de la température. A pH 8,6 la pyrophosphatase est plus aisément adsorbable sur alumine C γ que la glycérphosphatase qui peut être ainsi débarrassée de la pyrophosphatase associée. Avec P. FLEURY [76] nous avons montré que les pyrophosphatases et phosphomonoesterases d'Amande et de la taka-diastrase se comportaient

comme des diastases différentes présentant cependant de nombreux caractères communs (pH optima identiques, inactivations thermiques parallèles dans diverses conditions).

d) l'adénylpyrophosphate ou adénosinetriphosphate qui joue un rôle très important dans le métabolisme des glucides serait dédoublé par une diastase spécifique l'*adénylpyrophosphatase* qui se rencontre entre autres dans le foie.

e) la *phytase*. L'ester hexaphosphorique de l'inositol est lentement hydrolysé par les phosphatases de graines et de la taka-diastrase, P. FLEURY et J. COURTOIS [76] ; les phosphatases animales, dont le pH optimum se place vers 8,0-9,0, et la taka-diastrase purifiée sont pratiquement sans action sur la phytine. L'existence d'une phytase spécifique distincte des phosphomonoestérases reste encore douteuse car elle n'a en sa faveur que quelques preuves négatives.

f) les *lécithinases* de FOLLEY et KAY ou *lécithidases*. De nombreuses diastases semblent intervenir pour disloquer complètement la molécule des phosphoaminolipides. A côté de lipases plus ou moins spécifiques on rencontre d'autres diastases qui rompent les liaisons reliant le phosphore aux composés organiques. Nos connaissances sur le mode d'enchaînement des constituants des lécithides sont encore trop imprécises pour pouvoir conclure à l'existence de phosphatases spécifiques de ces lipides ternaires.

g) la *métaphosphatase* de KITASATO [130]. La métaphosphatase hydrolyse le métaphosphate de soude en orthophosphate. Ce serait la seule diastase pouvant réagir sur des substances minérales qui n'ont jamais été décelées chez les êtres vivants. Cependant GIBAYLO et UMSCHWEIF [86] ont signalé dans la levure de brasserie l'existence d'une substance phosphorée intermédiaire entre les pyro- et métaphosphates.

h) NEUBERG et FISCHER [162-163] viennent de signaler

récemment que le triphosphate résultant de l'union de trois molécules d'acide phosphorique avec élimination de deux molécules d'eau peut fixer ces deux molécules sous l'influence d'une diastase présente dans la taka-diastase et la levure ; il s'agit vraisemblablement d'une *triphosphatase* spécifique différente de la pyrophosphatase.

i) la phosphocréatine et la phosphoarginine seraient hydrolysables par une diastase spécifique la *phosphoamidase*.

j) Enfin les esters phosphoriques de l'amidon seraient également hydrolysés par une phosphatase spécifique l'*amylophosphatase* qui fluidifie l'empois d'amidon et peut être privée d'amylases plus adsorbables sur kaolin. WALDSCHMIDT-LEITZ et MAYER [208], PRINGSHEIM et LOEW [175].

LES PHOSPHOMONOESTÉRASES.

CHAMP D'ACTION. — Les phosphomonoestérases semblent susceptibles d'hydrolyser toute une gamme d'esters phosphoriques d'alcools ou de phénols ; ces dérivés hydroxylés se placent dans les séries les plus diverses de la chimie organique. Nous donnons ici la liste des esters phosphoriques les plus caractéristiques du champ d'action très étendu de ces phosphatases.

a) *esters d'alcools*. — Les phosphatases peuvent hydrolyser les esters phosphoriques :

1) d'alcools aliphatiques : méthylique, éthylique, propyliques, amyliques, hexylique, cétylique, etc... [207, 164, 5, 170], de certains dérivés de ces alcools : aldéhyde glycolique [79], chloro et aminoéthanol ;

2) de polyols et de sucres ;

3) d'alcools cyclaniques : cyclohexanol [207] ;

4) d'alcools terpéniques : cholestérol [207], bornéol [167-90], menthol, fenchol [169].

b) *esters de phénols*. — Le phénylphosphate est un

substrat proposé par KING et ARMSTRONG [129] pour estimer l'activité phosphatasique des organes en dosant le phénol libéré. Cette technique a été utilisée par de nombreux chercheurs, la nitration en para du phénol ne paralyse pas l'activité phosphatasique [207, 170]. Les esters des trois diphénols dérivant du benzène [150], ceux des naphthols [207] sont également dédoublés.

Comme d'autres diastases la phosphatase possède des réactivités différentes vis-à-vis de stéréoisomères : l'hydrolyse des esters racémiques du bornéol et du fenchol libère principalement les alcools lévogyres [167, 90, 169].

CLASSIFICATION DES PHOSPHOMONOESTÉRASES.

FOLLEY et KAY ont proposé de classer ces diastases en quatre principaux groupes qui se différencient par leurs activités en fonction du pH, leurs sensibilités différentes à certains composés chimiques et dans certains cas leur action sur les α et β -glycérophosphates. Nous envisagerons successivement ces principaux caractères.

A) *pH optimum.*

FOLLEY et KAY distinguent :

1) la phosphomonoestérase alcaline A_1 , la mieux connue, de pH optimum entre 8,0 et 9,0 ; elle est très répandue dans tous les tissus de Mammifères ; dans le règne végétal on la retrouve chez certaines bactéries et Champignons inférieurs, PETT et WYNNE [172], SCHUCHARDT [195], mais à notre connaissance elle n'a jamais été signalée chez les végétaux supérieurs.

2) la phosphomonoestérase A_2 de pH optimum entre 5 et 6 (5,6 en général) est caractéristique des Phanérogames : son de Riz, UZAWA [207] ; graines diverses, NEMEC [160], J. COURTOIS [54] ; feuilles de diverses plantes, PRATESI [174] ; tubercules, PFANKUCH [173].

Cette phosphatase a été retrouvée dans différents organes de Mammifères où elle coexiste en général avec la

phosphatase A_1 ; cependant la prostate, le sperme, l'urine renfermeraient exclusivement cette phosphatase A_2 .

D'une façon générale la phosphatase A_1 est solidement liée aux composés tissulaires, ce serait une *desmophosphatase*, en adoptant la terminologie de WILLSTÄTTER et ROHDEWALD [218] ; ce desmoenzyme est en général solubilisé par autolyse du tissu. La phosphatase A_2 , par contre, se comporte fréquemment comme une *lyophosphatase* facilement extractible par l'eau.

3) la phosphomonoestérase A_3 , de pH optimum vers 3,0-4,0, est caractéristique de la taka-diastrase ; elle a été retrouvée dans le rein, MUNEMURA [157], OHMORI [170] ; le foie et la rate, BAMANN et SALZER [19] et la levure haute, H. et E. ALBERS [3].

4) les hématies contiendraient une phosphomonoestérase A_4 de pH optimum 6,5 ; cependant par purification le pH optimum se déplace vers la zone alcaline et se rapproche de celui de la phosphatase A_1 , ROCHE et LATREILLE [185], SCHÄFFNER et BAUER [190-191] ont séparé de la levure une phosphatase du type A_4 .

B) *Inactivation des phosphatases en fonction du pH.*

Ces phosphatases à pH optima différents présentent par contre des courbes de stabilité en fonction du pH assez voisines : de pH 5 à pH 7 l'inactivation est en règle générale nulle ou minime, elle est rapidement totale vers pH 9 et 10 et croît d'une façon plus lente entre pH 3 et 4.

Selon KING [128] la phosphatase A_1 rénale a son maximum de stabilité vers pH 7,0-8,0 et de 6,5 à 8,2 selon JACOBSEN [110]. Ce maximum se place vers pH 5,0 pour la phosphatase A_1 des glandes mammaires, FOLLEY et KAY [82] ; de pH 3,7 à 6,0 pour la diastase A_2 de la prostate, KUTSCHER et WÖRNER [144] et de pH 7,6 à 8,9 pour la phosphatase A_4 de levure, BAUER [25].

Bien que ces différences de sensibilité aux ions H et OH soient minimes, elles permettent cependant d'inac-

tiver sélectivement l'une ou l'autre des phosphatases coexistant dans un même tissu : l'ammoniaque inactive plus rapidement les phosphatases A_2 et A_3 que la phosphatase A_1 : tissus animaux, BAMANN et DIEDERICHS [13] ; levure, SCHUCHARDT [195-196]. Inversement l'acide acétique inactive plus vite la phosphatase A_1 que A_2 et A_3 , BAMANN et DIEDERICHS [14], SCHUCHARDT [195-196].

C) *Purification des phosphatases.*

Les fractionnements alcooliques et acétoniques se sont montrés jusqu'ici les plus fructueux pour isoler des préparations à haute activité phosphatasique : phosphatases du rein et de la levure, H et E. ALBERS [2-3] ; du Soja, GIRI [88] ; de la Pomme de terre, PFANKUCH [173].

Les techniques d'adsorption ont en général fourni des résultats plutôt décevants ; cependant les diverses phosphatases semblent assez adsorbables sur les adsorbants usuels :

a) *Kaolin* : diastases A_1 du rein, ASAKAWA [5], ROCHE et LATREILLE [186] ; A_2 du riz, UZAWA [107] ; des Invertébrés marins, NORRIS et RAO [168] ; A_3 de la takadiastase, KOBAYASHI [133], UZAWA [207] ; de la levure, H. et E. ALBERS [3] ; A_4 des hématies, ROCHE [182].

b) *Alumine* : phosphatases A_1 du rein, ASAKAWA [6], H. et E. ALBERS [2] ; des tumeurs, KRAUT et BARKOWSKY [135] ; du foie, ROCHE et LATREILLE [186] ; A_2 des Invertébrés marins, NORRIS et RAO [168] ; A_3 de levure, H. et E. ALBERS [3] ; A_4 des hématies, ROCHE [182]. La phosphatase A_1 rénale est également adsorbable sur acide stéarique, EHRENSVÄRD [65] ou hydroxyde ferrique, H. et E. ALBERS [2]. Il est généralement difficile et parfois impossible d'éluer ces phosphatases adsorbées, ASAKAWA [5], ROCHE [182], H. et E. ALBERS [2, 3].

D'autre part une dialyse prolongée inactive en général les phosphatases ; cette inactivation a un caractère irréversible et l'addition de dialysat ne réactive que peu ou pas l'enzyme. L'élimination des substances inactives

associées par défécation au phosphate de plomb naissant ou *préadsorption* (*voradsorption*) est une méthode proposée par KRAUT et PANTSCHENKO-JUREWICZ [136] pour obtenir une préparation d'estérase hépatique purifiée. Cette technique a permis à BAMANN et SALZER [19] d'éliminer en partie la phosphatase hépatique A_2 et d'obtenir une préparation de phosphatase hépatique A_3 ne donnant que faiblement les réactions des protides.

D) *Action de divers composés chimiques sur les phosphatases.*

Certains composés inhibent tous les types de phosphatases tandis que d'autres agissent sélectivement. Enfin quelques corps comme les sels de magnésium activent principalement les phosphatases A_1 .

1) *Inhibiteurs généraux.*

a) *Action des produits d'hydrolyse.* — La cinétique de la phosphatase montre que l'hydrolyse ne s'effectue pas toujours selon la loi des réactions monomoléculaires ; la vitesse de réaction diminue rapidement, beaucoup plus que ne le permettrait l'inactivation irréversible assez lente de la diastase ; ce ralentissement provient de l'action inhibitrice des phosphates libérés, action qui est générale pour les phosphatases des divers groupes : A_1 du rein, ERDTMANN [67, 68], HOMMERBERG [100], KAY [124], JACOBSEN [109, 111], MUNEMURA [157], BAMANN et RIEDEL [17] ; de l'os, MARTLAND et ROBISON [151] ; du sang, ROCHE [182] ; de l'intestin, KAY [124], WESTENBRINK [211].

A_2 du Riz, MUNEMURA [157] ; du *Clostridium acetobutylicum*, PETT et WYNNE [172] ; de la Pomme de terre, PFANKUCH [173] ; A_3 du rein et de la taka-diastrase, MUNEMURA [157], OHMORI [170] ; A_4 de la levure, SCHÄFFNER et BAUER [191]. JACOBSEN [109, 111] a étudié en détail le mécanisme de cette inhibition par les phosphates.

tes qui se comportent à la fois comme des inhibiteurs concurrents et des inhibiteurs absolus, ces deux inhibitions variant avec le pH.

Dans le cas des glycérophosphates le second produit d'hydrolyse : le glycérol, n'exerce pas d'action inhibitrice tout au moins à des concentrations équimoléculaires à celles du substrat. En dehors de ROCHE [182] qui a signalé une inhibition des phosphatases du sang et de SCHÄFFNER et BAUER [191] qui ont observé une faible inhibition de la phosphatase A_4 de levure les autres auteurs ont trouvé que le glycérol était sans influence sur les phosphatases A_1 : osseuse, MARTLAND et ROBISON [151] ; rénale, ASAKAWA [5], KAY [124] ; hépatique, BAMANN et RIEDEL [17] ; intestinale, KAY [124], WESTENBRINK [211] et la phosphatase A_2 des graines oléagineuses, FERNANDEZ et PIZARROSO [73].

b) *Action des arsénates.* — Les arsénates accélèrent en général la libération du phosphore minéral à partir des esters phosphoriques de glucides mais se comportent, au même titre que les phosphates, comme des inhibiteurs généraux des diverses phosphatases : A_1 rénale, ERDTMANN [67-68], MUNEMURA [157], PETT et WYNNE [172] et intestinale, KLEIN et ROSSI [131]. A_2 du Riz, MUNEMURA [157] et de la Pomme de terre, PFANKUCH [173]. A_3 du rein, MUNEMURA [157] et de la taka-dias-tase, PETT et WYNNE [172]. A_4 des hématies, PETT et WYNNE [172]. Cependant les arsénates sont sans influence sur la phosphatase du sérum, BRAUNSTEIN [36] et activent la préparation de taka-dias-tase de MORII [155] et la phosphatase du *Propionibacterium jensenii*, PETT et WYNNE [172].

c) *Autres inhibiteurs.* — En dehors des inhibiteurs généraux de toutes les diastases (sels de métaux lourds, agents précipitants des protides) les phosphatases sont peu sensibles à l'action des alcaloïdes : la quinine et les alcaloïdes voisins n'ont pas d'influence sur les phosphatases osseuse, rénale et intestinale, BODANSKY [35] ; la

physostigmine n'inhibe pas la phosphatase A_2 du Riz, FRANCIOLI [84]. La strychnine ralentit la vitesse d'hydrolyse du d. l. bornylphosphate par la taka-diastrase et diminue le pouvoir rotatoire lévogyre du mélange des deux alcools libérés, KUROYA [141]. Enfin les composés sulfhydrylés inhibent certaines phosphatases, SCHÄFFNER et BAUER [190].

II) Inhibiteurs spécifiques.

Les oxalates inhibent certaines phosphatases alcalines probablement parce qu'ils précipitent le magnésium activateur ; par contre les fluorures qui sont pratiquement sans influence sur les phosphatases à pH optimum en milieu alcalin inhibent les autres types de phosphatases.

ACTION DES FLUORURES SUR LES PHOSPHATASES.

α) A pH optimum en milieu acide.

INOUE [105] signala en 1927 que la phosphatase A_3 de la taka-diastrase était fortement inhibée par le fluorure de sodium. Lorsque l'inhibition est partielle le pH optimum se déplace vers l'alcalinité. Le fluorure n'intervient pas en précipitant le calcium car Cl_2Ca , qui réactive la diastase inhibée par les sulfates et oxalates, ne la réactive pas dans l'inhibition fluorée, INOUE [107]. Cette action inhibitrice fut confirmée par ASAKAWA [5], puis AUHAGEN et GRZYCKY [7] qui montrèrent que la taka-diastrase, très sensible au fluorure à pH 5,0, y est insensible vers pH 9,0. En 1936, BAMANN et SALZER [20] identifièrent dans la taka-diastrase une phosphatase A_3 fortement inhibée par le fluorure de sodium et une phosphatase A_2 peu sensible à ce sel ; ce qui expliquerait le déplacement du pH optimum vers la zone alcaline dans l'inhibition fluorée.

Le fluorure inhibe également la phosphatase A_3 du

rein, MUNEMURA [157] ; les diastases de la levure, AUHAGEN et GRZYCKY [7], mais son action est particulièrement nette avec les phosphatases A_2 de diverses origines.

1) *Animale*. — Diastases hépatique et rénale plus sensibles que les phosphatases osseuse et sérique, BELFANTI, CONTARDI, ERCOLI [28] ; phosphatases du cerveau, CEDRANGOLO [42] ; de la prostate et des produits d'éjaculation, KUTSCHER et WÖRNER [144]. En éliminant le fluorure de sodium par dialyse ou précipitation calcique les phosphatases hépatique et rénale sont partiellement réactivées, BELFANTI et collaborateurs [28].

2) *Végétale*. — Phosphatases du Riz, MUNEMURA [157] ; du Soja, GIRI [88] ; de la Pomme de terre, PFANKUCH [173] ; des feuilles, PRATESI [174] ; de certaines bactéries, PETT et WYNNE [172].

β) *Phosphatases à pH optimum en milieu alcalin.*

Le fluorure de sodium inhibe les phosphatases de Mammifères en général, KAY [124] et de l'os en particulier, ROSSI [188], ROBISON et ROSENHEIM [181] ; cependant divers auteurs n'ont pu observer d'action inhibitrice sur les phosphatases du rein, ASAKAWA [5], MUNEMURA [157] ; du lait, CONTARDI [51] ; du rein, du foie, des os et du sérum qui sont cependant partiellement inactivées par contact avec FNa en milieu acide, BELFANTI, CONTARDI et ERCOLI [28, 29]. Enfin YAMANE [222] a signalé que FNa accélérât l'hydrolyse des esters fructose-6, glucose-6 et diéthylorthophosphoriques par l'enzyme des os et cartilages.

III) **Activateurs spécifiques.**

On ne connaît pas encore d'activateurs généraux des phosphatases ; par contre certaines phosphatases sont activables par les sels de magnésium, l'acide ascorbique et les amino-acides.

a) *Action des sels de magnésium.* — En règle générale les phosphatases insensibles à l'action inhibitrice des fluorures sont activées par les sels de magnésium et inversement. ERDTMANN [67-68] fut le premier à signaler que les sels de Mg augmentaient l'activité de la phosphatase rénale. HOMMERBERG [100], puis JENNER et KAY, [117] confirmèrent ce fait ; ces deux derniers auteurs montrèrent que les phosphatases A_1 animales étaient activables, cette activation étant maxima pour une certaine concentration en magnésium (q. optimum Mg.).

Il semble bien que toutes les monoestérases A_1 sont activées par Mg : os, ROSSI [188], DAVIES [61] ; rate, DAVIES [61] ; cerveau, CEDRANGOLO [42], GIRI et DATTA [89] ; glande mammaire, FOLLEY et KAY [82] ; lait, CONTARDI [51] ; salive, GIRI [87] ; dents, MAC KENZIE [149]. Le magnésium active également les monoestérases A_4 : hématies, JENNER et KAY [117], DAVIES [61], etc... ; levure, SCHÄFFNER et BAUER [191] ; certaines phosphatases A_2 : Riz, MUNEMURA [157], Invertébrés marins, NORRIS et RAO [168] sont activées ; il en serait de même des phosphatases bactériennes de PETT et WYNNE [172].

Par contre un grand nombre de phosphatases à pH optimum en milieu acide sont insensibles à l'action du magnésium, c'est le cas des phosphatases A_2 suivantes : rate, DAVIES [61] ; rein, BAMANN et RIEDEL [17] ; urine, KUTSCHER [142] ; prostate, KUTSCHER et WÖRNER [144] ; salive, GIRI [87] ; cerveau, GIRI et DATTA [89] et Soja, GIRI [88].

Le magnésium inhiberait même légèrement les phosphatases A_3 : rein, MUNEMURA [157] ; levure haute, H. et E. ALBERS [3] et taka-diastrase, BAMANN et SALZER [20].

L'activation magnésienne de la phosphatase A_1 est assez constante et indépendante de certaines affections : avitaminoses A et C, Mlle EMERIQUE [66], SCOZ, CATTANEO, GABBRIELLI [198] ; cancer, KOHLER [134] ; cependant l'enzyme de l'os n'est activable que lorsque les os ont dépassé la première étape de leur croissance, ROCHE,

FILIPPI et LEANDRI [183]. Enfin le cancer ne modifie pas la susceptibilité d'activation de la phosphatase A_1 des hématies, SCHOONOVER [193].

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour interpréter le mécanisme de l'activation magnésienne. Il est douteux que Mg soit un constituant des phosphatases : le *Clostridium acetobutylicum* sécrète une diastase très active et ne renfermerait que des doses infinitésimales de magnésium, PETT et WYNNE [172] ; la phosphatase rénale purifiée des ALBERS [2] est fort active et contient moins de 1 p. 1000 de magnésium dans l'extrait sec.

Selon BAMANN, RIEDEL et DIEDERICHs [18] les desmophosphatases sont moins activables que les lyophosphatases ; la susceptibilité d'activation serait ainsi en raison inverse de la complexité du support colloïdal.

Un certain nombre d'auteurs : BAMANN et RIEDEL [17], BELFANTI, CONTARDI et ERCOLI [30], CATTANEO [41] admettent que le magnésium réduit l'action inhibitrice concurrente des phosphates ; HOLMBERG [99] a en effet montré que Mg n'activait la phosphatase intestinale qu'au delà d'un certain pourcentage d'hydrolyse du substrat ; il se ferait une combinaison diastase-magnésium, moins sensible à l'inhibition par l'ion PO_4 . BAUER [26] a proposé une interprétation légèrement différente : il se ferait une combinaison substrat magnésium [S.Mg.] s'unissant par le métal à la diastase D ; la combinaison

[D.Mg.S.] se transposerait en $D \begin{smallmatrix} \swarrow Mg \\ | \\ S \end{smallmatrix}$ seule susceptible

de transformer le substrat, transformation que la combinaison normale [D.S.] ne peut réaliser.

La loi d'action de masse régit ces diverses combinaisons dissociables. Il en résulte que la quantité de magnésium nécessaire à l'activation augmente avec la concentration du substrat. Le calcium intervient également selon l'antagonisme classique Ca/Mg.

b) *Action de l'acide ascorbique.* — Cette vitamine est sans influence sur les phosphatases A_2 végétales, GIRI

[88], PFANKUCH [173] ; selon THIANNHAUSER et ses collaborateurs [205] l'acide ascorbique activerait considérablement la phosphatase plasmatique, les enzymes activés des sérums normaux et hyperphosphatasémiques possédant des activités égales.

c) *Action des amino-acides.* — Ces corps, la glycine en particulier, activent les phosphatases A_1 , BODANSKY [33-34].

E) *Action des phosphatases sur les α et β -glycérophosphates.*

L'acide α -glycérophosphorique où l'une des deux fonctions alcool primaire du glycérol est estérifiée et l'acide β où la fonction alcool secondaire est estérifiée possèdent une structure différente et devraient se comporter d'une façon dissemblable vis-à-vis des agents d'hydrolyse chimiques et biochimiques. Comme nous allons le voir il n'en est rien avec les réactifs chimiques, mais par contre la plupart des diastases dédoublent les deux isomères à des vitesses inégales.

1) ACTION DES RÉACTIFS CHIMIQUES.

O. BAILLY [10] signala le premier que les vitesses d'hydrolyse spontanée des deux formes sont égales ; par la suite P. FLEURY et SUTU [81] montrèrent que ClH à diverses concentrations dédoublait aussi lentement les deux isomères à 100° . Ces deux corps présentent par ailleurs une résistance égale à l'action saponifiante des alcalis. A 100° les constantes des réactions monomoléculaires d'hydrolyse par SO_4H_2 N sont presque égales 281.10^{-5} (α) contre 266.10^{-5} (β), RAE, KAY et KING [178].

2. ACTION DES PHOSPHATASES.

Tandis que certaines phosphatases ne présentent pas plus de spécificité que les agents d'hydrolyse chimique, la

plupart des phosphatases hydrolysent plus rapidement l'une ou l'autre forme. Il semble assez difficile de classer les diastases d'après leur action sur les α et β glycérophosphates, comme certains auteurs ont voulu le faire, des phosphatases par ailleurs très proches réagissant différemment sur les glycérophosphates.

a) Les phosphatases suivantes hydrolysent les deux isomères à des vitesses sensiblement identiques : hétopancréas d'Escargot KARRER et FREULER [121], phosphatases A_2 de diverses graines J. COURTOIS [54] et de la prostate KUTSCHER et WOLBERG [143].

b) Un grand nombre de phosphatases hydrolysent le β glycérophosphate plus rapidement que l' α : Phosphatases A_1 du rein KAY [123], KAY et LEE [126], SCHÄFFNER et BAUER [191], NEUBERG et SCHUCHARDT [166], REIS [179], des leucocytes et du sérum ROCHE [182], ROCHE et LATREILLE [184], de l'intestin ROCHE [182], de la rate DAVIES [61], de la substance blanche cérébrale du Veau et du nerf de Cheval REIS [179].

Phosphatases A_2 de la rate DAVIES [61], de l'urine KUTSCHER [142], du sperme REIS [180], des graines de Soja KAY et LEE [126], J. COURTOIS [54], GIRI [88], du son de Riz CONTARDI et ERCOLI [50], des graines de Chélidoïne, Pavot, Moutardes, Chou, Lin, Fève et Navet, J. COURTOIS [54], de la Pomme de terre PFANKUCH [173], des feuilles de Pois, Epinard, Trèfle et Fève PRATESI [174], du *Clostridium acetobutylicum* PETT et WYNNE [172]. Phosphatase A_3 de la taka-diastrase ASAKAWA [6], KAY et LEE [126], J. COURTOIS [54], NEUBERG et SCHUCHARDT [166], BAMANN et SALZER [20].

c) Enfin quelques phosphatases hydrolysent plus rapidement l' α glycérophosphate (1) que son isomère ; phosphatases : osseuse purifiée DE RIENZO [62], du suc musculaire NEUBERG et SCHUCHARDT [166], du cerveau CE-

(1) RAE KAY et KING [178] n'ont pas observé d'hydrolyse préférentielle de l'un ou l'autre des deux stéréoisomères dans l' α -glycérophosphate racémique soumis à l'action de diverses phosphatases.

DRANGOLO [42] et surtout la phosphatase A_4 des hématies anucléées ROCHE [182], HORII [102], DAVIES [61] ou nucléées (Pigeon) ROCHE et LATREILLE [184]. Les hématies normales et cancéreuses hydrolysent toujours plus rapidement l' α SCHOONOVER [193] ; les hémolymphes d'Escargot et de Crabe ROCHE et LATREILLE [184], le *Propionibacterium jensenii* PETT et WYNNE [172] et la phosphatase A_2 des feuilles d'Amandier J. COURTOIS et P. DENIS (non publié) hydrolysent également l' α glycérophosphate plus rapidement que son isomère.

A côté de ces diverses phosphatases dont le comportement est indépendant du pH d'autres diastases ont un comportement variable ; c'est ainsi qu'à pH 7,6 la phosphatase plasmatique hydrolyse l' α glycérophosphate deux fois plus vite que le β , ce dernier étant par contre dédoublé plus rapidement à pH 8,9 KAY et LEE [126].

Les glycérophosphatases des levures ont soulevé de nombreuses controverses par suite de la coexistence de plusieurs types de phosphatases à spécificité différente. SCHÄFFNER, BAUER et KRUMEY [192] distinguent :

1. la phosphatase A_1 de SCHUCHARDT [195] qui hydrolyse le β glycérophosphate plus rapidement que l' α .

2. la phosphatase A_3 de levure haute des ALBERS [3] qui hydrolyse le β glycérophosphate plus rapidement que l' α .

3. la phosphatase A_4 de SCHÄFFNER et BAUER [191] qui la dénomment α glycérophosphatase car elle dédouble l' α glycérophosphate beaucoup plus rapidement que le β . SCHÄFFNER et BAUER [191] utilisèrent d'ailleurs cette diastase pour doser l' α glycérophosphate dans un mélange des deux isomères. Selon SCHÄFFNER et BAUER les α et β glycérophosphates seraient dédoublés par des diastases différentes. SCHUCHARDT [194] mit en doute cette existence et ne put isoler une α glycérophosphatase spécifique d'un autre échantillon de levure mais BAUER, SCHÄFFNER et KRUMEY [27] réussirent à séparer une α glycérophosphatase de l'échantillon de levure de SCHUCHARDT. Cependant il n'est pas certain qu'il existe une

diastase susceptible d'hydrolyser exclusivement l'isomère α . L' α glycérophosphatase avant purification hydrolyse 61 p. 100 d' α contre 2,1 p. 100 de β et 82,2 p. 100 d' α contre 10,2 p. 100 de β . Après élimination d'autres phosphatases coexistantes et plus adsorbables sur alumine l' α glycérophosphatase purifiée hydrolyse 65,1 p. 100 d' α contre 11,8 p. 100 de β . La purification a donc accru l'activité relative vis-à-vis du β glycérophosphate, ce qui apparaît contraire à l'existence de deux glycérophosphatases différentes.

Certaines des phosphatases de levure sont inactivables sélectivement ce qui modifie la spécificité de la préparation partiellement inactivée SCHUCHARDT [195-196].

Il est également possible de modifier la spécificité des phosphatases animales. La phosphatase A_4 des hématies adsorbée sur kaolin et éluée par l'ammoniaque voit son pH optimum se déplacer vers 8,9 et hydrolyse le β glycérophosphate plus rapidement que l' α ROCHE et LATREILLE [185].

Ces deux auteurs ont également montré que le rapport des activités relatives vis-à-vis des deux glycérophosphates de diverses préparations de phosphatase rénale varierait avec le mode d'obtention de ces préparations (autolyse-adsorption). *A priori* les vitesses de réaction dissemblables vis-à-vis des glycérophosphates de préparations diastasiques extraites de la même matière première ne prouvent pas l'existence d' α et β glycérophosphatases différentes ; la seule preuve serait la séparation d'une diastase agissant exclusivement sur un seul des glycérophosphates, ce qui, à notre connaissance, n'a jamais été réalisé. Les différences des vitesses de réactions peuvent très bien être interprétées par des modifications de l'affinité de la diastase vis-à-vis des deux isomères ou encore par des sensibilités différentes à l'action inhibitrice des produits d'hydrolyse. Certaines observations plaident en faveur de notre manière de voir ; H. et E. ALBERS [2] ont montré que la purification de la phosphatase rénale diminuait son affinité vis-à-vis du β glycérophosphate.

NEUBERG et SCHUCHARDT [166] et SCHUCHARDT [195-196] ont montré que dans certains cas la même préparation de phosphatase qui hydrolysait initialement un glycérophosphate plus rapidement que son isomère, dédoublait plus rapidement l'autre isomère pour un pourcentage d'hydrolyse élevé.

Au cours de nos recherches nous avons été amené à considérer que les α et β glycérophosphates étaient dédoublés par la même diastase, les différences d'affinités et de vitesses maxima d'hydrolyse permettant d'interpréter l'hydrolyse plus rapide de l'une ou l'autre forme. Il est vraisemblable qu'il en est de même avec les autres préparations où l'on a voulu voir des α et β glycérophosphatases spécifiques ; en tout cas aucun fait ne contredit à *priori* cette interprétation.

F. — *Action synthétisante des phosphatases.*

Nous n'envisagerons pas la synthèse biochimique des esters phosphoriques de glucides qui s'accompagne de processus oxydo-réducteurs où plusieurs diastases semblent intervenir SCHÄFFNER [189]. En présence de fortes concentrations en alcools et en phosphates les phosphatases A_1 catalysent la biosynthèse d'esters phosphoriques. MARTLAND et ROBISON [151] furent les premiers à mettre en évidence cette diminution de la teneur en phosphore minéral avec le mannitol, le glycérol et le glycol. Cette diminution a été retrouvée avec les phosphatases du rein et du duodénum KAY [124], de la glande mammaire FOLLEY et KAY [82], du sang ROCHE [182], du lymphôme du Lapin tuberculeux MORII [156], des dents MAC KENZIE [149].

KAY a pu isoler et identifier les esters synthétisés par la phosphatase duodénale ; le glycolphosphate obtenu par biosynthèse est identique au composé obtenu par synthèse chimique [145]. Le corps obtenu en présence de glycérol est un mélange de glycérophosphates KAY [124] ; l'action des phosphatases du rein et de la taka-

diastase sur le glycérophosphate brut ou ses diverses fractions à solubilités différentes montre que le corps obtenu par biosynthèse se comporte comme un mélange de glycérophosphates qui contient au minimum 85 p. 100 d' α glycérophosphate KAY et LEE [126], RAE, KAY et KING [178] ; il n'a pas été possible d'y caractériser le β glycérophosphate par précipitation du complexe avec le nitrate de baryum de KARRER et SALOMON [122]. D'autre part SUZUKI et MARUYAMA [204] ont obtenu par biosynthèse avec la taka-diastase à pH 8,4 un mélange sensiblement équimoléculaire des deux glycérophosphates. Enfin MAC VICAR, d'après FOLLEY et KAY [83], a isolé le méthylphosphate obtenu par biosynthèse avec la phosphatase rénale ; l'étude de la cinétique de la réaction a permis d'observer l'action inhibitrice de fortes doses de phosphates.

Von EULER et ses élèves, SCHÄFFNER [189] etc., ont donné de nombreux arguments en faveur de l'existence d'une diastase uniquement synthétisante qui catalyserait la phosphorylation des glucides. Cette *phosphatèse*, selon la terminologie de G. BERTRAND, a pu être privée de phosphatase hydrolysante.

Il est presque certain que la phosphorylation des glucides est un processus fermentaire distinct ou intervient plusieurs diastases et qui se trouve sous la dépendance du potentiel d'oxydo-réduction du milieu. WALDSCHMIDT-LEITZ [209]. A notre connaissance il n'y a pas encore de résultats permettant de savoir si la même phosphatase catalyse les réactions hydrolysantes et synthétisantes ou s'il existe une ou plusieurs phosphatèses exclusivement synthétisantes.

CHAPITRE II.

LA COMBINAISON DIASTASE-SUBSTRAT.

Introduction.

Au cours de la réaction diastasique le substrat s'unirait avec la diastase pour donner une combinaison intermédiaire diastase-substrat permettant la transformation de ce dernier. Cette combinaison se décomposerait alors pour régénérer la diastase primitive et libérer les produits terminaux de la réaction diastasique.

WURTZ [221] fut probablement le premier à formuler cette conception ; il observa que la papaïne était énergiquement fixée par la fibrine ; la papaïne libérée après digestion du substrat exerce alors son action sur une nouvelle portion de fibrine. Cette hypothèse reprise par BROWN en 1902 [39] fut précisée par BROWN et GLENDINING [40]. Depuis cette époque de nombreux auteurs ont eu recours à cette hypothèse pour interpréter les phénomènes diastasiques. De multiples observations étayent d'ailleurs cette conception.

Preuves en faveur de l'existence d'une combinaison diastase-substrat.

1. LE SUBSTRAT PEUT PROTÉGER LA DIASTASE CONTRE L'INACTIVATION.

a) *Thermique* : saccharose et sucrase SULLIVAN et TOMPSON [203], HUDSON et PAINE [104] ; malate de sodium et fumarase JACOBSON et PEIREIRA [112], glucose

ou lactate de sodium et déshydrogénase du *Staphylococcus* BACH [9].

b) *Chimique* le saccharose protège la sucrase de levure contre l'inactivation par l'acide nitreux ; le lactose et le maltose non hydrolysables par la sucrase sont sans action protectrice MYRBÄCK [159] ; le substrat protège la xanthine-oxydase contre l'action inhibitrice des cyanures, et l'amino-acide-oxydase contre l'inhibition par SH_2 KEILIN [127].

c) *Diastasique* l'asparagine protège l'asparaginase d'*Aspergillus* contre l'inactivation par autolyse BACH [8].

2. LE SUBSTRAT PEUT ÉLUE SPÉCIFIQUEMENT LA DIASTASE ADSORBÉE.

AMBARD [4] a montré que l'amidon cru pouvait fixer l'amylase ; l'empois d'amidon et le glycogène sont parmi les rares substances capables d'éluer l'amylase. (Récemment AMBARD et Mlle TRAUTMANN [4 bis] ont d'ailleurs proposé une nouvelle interprétation du mécanisme des réactions diastasiques faisant intervenir la notion d'une combinaison intermédiaire diastase-substrat). De même le saccharose élue la sucrase adsorbée sur charbon ERIKSON [69]. Les glucidases du Muguet (sucrase, maltase, lactase, β glucosidase) adsorbées sur alumine, kaolin ou hydroxyde ferrique, sont éluées isolément et sélectivement par leurs substrats spécifiques KRITSCHESKAJA [137].

3: LA VITESSE DE RÉACTION EST FONCTION DU RAPPORT DIASTASE-SUBSTRAT.

Si on oppose des doses croissantes de substrat à une quantité constante de diastase, la vitesse de réaction, tout d'abord proportionnelle à la concentration du substrat, devient maxima puis reste constante à partir d'une certaine concentration de ce dernier. Tout se passe comme si la diastase était saturée de substrat, COLIN et Mlle CHAUDUN [46].

Inversement si on choisit comme variable indépendante la concentration en diastase la vitesse de réaction croît tout d'abord avec la concentration en diastase puis, à partir d'une certaine dose de diastase, elle atteint son maximum ; la vitesse de réaction demeurant constante pour de plus fortes doses de diastase. La dose minima nécessaire pour atteindre ce palier représente le « *pouvoir fixateur* » de la diastase. COLIN et Mlle CHAUDUN [47], Mlle CHAUDUN [44] ont montré que le pouvoir fixateur de la β h-fructosidase de levure était le même pour des concentrations équimoléculaires de divers β h-fructosides (saccharose, raffinose, gentianose, stachyose). La β glucosidase ou l' α galactosidase réagissant sur une gamme de leurs substrats respectifs ont conduit à des résultats similaires COLIN et Mlle CHAUDUN [49], Mlle CHAUDUN [45].

4. LA COMBINAISON DIASTASE-SUBSTRAT EST CARACTÉRISABLE PAR DES TECHNIQUES PHYSIQUES.

Le spectre d'absorption caractéristique de l'hémine de la catalase disparaît par addition d'un corps qu'elle est susceptible de transformer : le monoéthylperoxyde d'hydrogène ; il se fait une combinaison diastase-substrat, de couleur rouge, dont le spectre d'absorption est analogue à celui de la combinaison : fraction hémine de l'hémoglobine-monoéthyl-peroxyde. Lorsque le substrat est décomposé cette combinaison disparaît et le spectre de la catalase libre régénérée apparaît à nouveau STERN [202].

Tout dernièrement J. LOISELEUR [146] a montré que l'addition de pepsine active diminuait immédiatement le potentiel électrocinétique des protéines, ce qui s'interprète par la formation d'une combinaison diastase-substrat où les groupes ionogènes du protéide sont partiellement bloqués. L'addition de pepsine inactivée par chauffage ne modifie pas ce potentiel électrocinétique.

Propriétés de la combinaison diastase-substrat.

La déduction la plus importante tirée de la notion d'une combinaison diastase-substrat est sans conteste l'étude de la dissociation de cette combinaison.

La dissociation de la combinaison diastase-substrat.

En 1913 MICHAELIS et MENTEN [153] ont appliqué la loi d'action de masse à la formation de la combinaison diastase-substrat. La concentration de la combinaison diastase-substrat [D.S.] est dans un rapport fixe avec le produit des concentrations [D.] en diastase et [S.] en substrat libres ; ce qui peut s'écrire en utilisant le même mode de représentation que pour les électrolytes dissociables :

$$\frac{[D.] \cdot [S.]}{[D. S.]} = K_m$$

Soit ψ la concentration moléculaire en diastase, φ la concentration moléculaire de la diastase liée au substrat et, partant de la combinaison diastase-substrat, [S.] la concentration moléculaire du substrat ; ψ et [S.] sont très différents en valeur absolue, ce qui est la caractéristique des réactions diastasiques où une molécule de diastase transforme un nombre extrêmement élevé de molécules de substrat. Il est donc possible, comme HEDIN [92] l'a vérifié, de négliger la faible proportion de substrat lié à la diastase devant la presque totalité du substrat libre ; nous pouvons donc écrire :

$$(1) \quad [S.]. [\psi - \varphi] = K_m \varphi$$

K_m est la constante de dissociation moléculaire de la combinaison diastase-substrat ou constante de MICHAELIS ; son inverse $K_M = \frac{1}{K_m}$ exprime l'affinité de la diastase pour le substrat. Il est d'ailleurs logique d'admettre que la vitesse initiale de réaction v est proportionnelle à la quantité de substrat fixé par la diastase, c'est-à-dire à

la concentration moléculaire de la combinaison diastase-substrat

$$(2) \quad v = C \psi$$

C est un facteur de proportionnalité que l'on peut mesurer dans un système arbitraire et maintenir aisément constant (pH, température, dilution etc, invariables) ; en remplaçant dans (2) ψ par sa valeur déduite de (1) nous obtenons :

$$(3) \quad v = C \psi \frac{[S.]}{[S.] + K_m}$$

C et ψ demeurant constants et $[S.]$ croissant, la vitesse initiale est maxima lorsque la diastase est saturée de substrat, K_m devient négligeable par rapport à $[S.]$ très grand ; le rapport $\frac{[S.]}{[S.] + K_m}$ tend vers 1. Il en résulte que lorsque la vitesse initiale est égale à la moitié de sa valeur maxima, ce second membre tend vers la valeur $1/2$ c'est-à-dire $[S.] = K_m$. La concentration moléculaire du substrat permettant une vitesse demi-maxima est égale à K_m .

MICHAELIS et MENTEN ont mesuré la vitesse d'hydrolyse du saccharose par la sucrase en fonction de la concentration du substrat. Si on porte en ordonnées les vitesses initiales et en abscisses $ps \doteq -\log [S.]$, la courbe obtenue, d'allure sinueuse, est analogue à la courbe du résidu de dissociation en fonction du pH d'un électrolyte faible. Cette courbe présente un point d'inflexion pour $[S.] = K_m$; (la constante de MICHAELIS présente ainsi une analogie avec le pK d'un acide faible).

Les courbes permettant de mesurer K_m peuvent être construites de deux façons différentes :

a) *Avec des ordonnées rationnelles.* — Soit V la vitesse de réaction nous pourrions l'exprimer en fonction de la vitesse initiale :

$$(4) \quad V = \frac{v}{C \psi} = \frac{[S.]}{[S.] + K_m}$$

Lorsque la vitesse initiale est maxima V tend vers 1 et

$$(5) \quad y = C \psi$$

En vue de différencier ces équations posons $s = \log [S.]$ (4) pourra s'écrire :

$$(6) \quad V = \frac{10^s}{10^s + K_m} = \frac{e^{ps}}{e^{ps} + K_m}$$

avec $p = 2,303$, ce qui donne par différenciation

$$(7) \quad \frac{dV}{ds} = \frac{p K_m \cdot e^{ps}}{(e^{ps} + K_m)^2}$$

lorsque $V = 1/2$ c'est-à-dire $s = \log K_m$

$$(8) \quad \frac{dV}{ds} = \frac{p \cdot K_m^2}{4 K_m^2} = \frac{p}{4} = 0,576$$

La pente de la tangente au point d'inflexion de la courbe est de 0,576 ce qui correspond sensiblement à une inclinaison de 30° sur l'axe des abscisses ; la courbe est à peu près rectiligne au voisinage du point d'inflexion et la tangente se confond avec la courbe ; ceci permet d'établir une échelle de coordonnées rationnelles, l'unité des ordonnées étant $\frac{V}{0,576}$ fois celles des abscisses et pour la vitesse maxima $V = \frac{1}{0,576} = 1,73$.

Il suffit de fixer expérimentalement quelques points de la courbe pour déterminer K_m par la tangente au point d'inflexion.

b) *Avec des ordonnées arbitraires.* — La vitesse maxima est mesurée expérimentalement ; son ordonnée est fixée arbitrairement. On établit par des expériences quelques points de la courbe entre $V = 1$ et $V = 0,5$ et on dessine symétriquement la seconde branche de la courbe.

On choisit l'une ou l'autre des deux méthodes de détermination selon la précision avec laquelle on peut mesurer soit les points médiaux soit les points terminaux de la courbe.

D'autres modes de représentation graphique ont été proposés :

1. EULER et LAURIN [70] portent en abscisses de progression arithmétique la concentration moléculaire du substrat et en ordonnées arbitraires la vitesse de réaction ; la courbe est asymptote à une parallèle à l'axe des abscisses d'ordonnée $V = 1/2$, la parallèle d'ordonnée $V = 1/2$ coupe la courbe au point d'abscisse $[S.] = K_m$.

2. Soit $V_{\max}$ la vitesse initiale maxima (5) et (3) donnent respectivement :

$$(9) \quad V_{\max} = C \downarrow$$

$$(10) \quad v = V_{\max} \cdot \frac{(S.)}{(S.) + K_m}$$

En inversant (10) nous avons :

$$(11) \quad \frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{[V_{\max}](S.)}$$

La variation de $\frac{1}{v}$ en ordonnées en fonction de $\frac{1}{S}$ en abscisses se représente par une droite de pente $\frac{K_m}{V_{\max}}$, coupant l'axe des ordonnées pour l'ordonnée $\frac{1}{V_{\max}}$.

La pente de la droite permet donc de mesurer K_m (LINEWEAVER et BURK [145]).

La détermination de la concentration moléculaire du substrat fournissant une vitesse de réaction demi maxima est d'ailleurs susceptible de renseigner sur l'évolution des réactions diastasiques même en abandonnant l'hypothèse initiale d'une combinaison diastase-substrat active. HERZOG [96] BARENDRECHT [23] n'ont pas admis l'existence d'une telle combinaison, et tout récemment MEDWEDEW [152] vient de proposer d'appliquer la mécanique quantique aux réactions diastasiques. En se basant sur l'action inhibitrice des fortes concentrations en substrat MEDWEDEW admet que la diastase unie au substrat devient inactive. Selon cet auteur la réaction diastasique est un échange énergétique entre la diastase et le substrat selon un choc non élastique du deuxième ordre, le substrat reçoit le nombre de quanta nécessaires à son activation et une fois activé se transforme.

Dans un mélange de diastase et de substrat MEDWEDEW distingue deux processus :

1. Une réaction chimique du premier ordre donnant naissance à une combinaison diastase-substrat où la diastase paralysée est inactive.

2. Des chocs non élastiques du deuxième ordre provoquant la transformation du substrat ; la vitesse de réaction se trouve ainsi proportionnelle au nombre de chocs et partant à la concentration de la diastase libre. La théorie de MEDWEDEW permet de raisonner d'une façon strictement inverse de celle de MICHAELIS. Les interprétations de certaines particularités des réactions diastasiques basées sur les variations de la constante de MICHAELIS restent finalement semblables, que l'on adopte l'une ou l'autre des deux théories, si on a soin de substituer à la notion de dissociation de MICHAELIS celle de stabilité de MEDWEDEW et vice-versa. Nous continuerons d'adopter le point de vue de MICHAELIS, plus intuitif, plus pratique et plus classique sans préjuger de la valeur de la thèse de MEDWEDEW.

Influence de différents facteurs sur la stabilité de la combinaison diastase-substrat.

Pour faciliter la compréhension de cet exposé nous avons préféré adopter le mode de représentation en affinité K_M qui traduit mieux les faits que son inverse : la constante de MICHAELIS $K_{1,1}$. Nous envisagerons successivement les facteurs sans influence sur l'affinité, les facteurs la faisant varier et finalement nous comparerons l'affinité à deux autres caractéristiques quantitatives des diastases : le pouvoir fixateur et la vitesse maxima d'hydrolyse.

A. — FACTEURS NE MODIFIANT PAS L’AFFINITÉ

1. *Concentration en diastase.*

Comme il est possible de le calculer l’affinité doit être indépendante de la concentration en diastase ; l’expérience confirme les prévisions théoriques: l’affinité de la sucrase pour le saccharose se maintient aux environs de 60,0 avec des concentrations variables en autolysat de levure (dans les rapports 1, 2 et 4) MICHAELIS et MENTEN [153]. Avec 10 et 20 cm³ d’autolysat de levure purifiée EULER et LAURIN [70] calculèrent respectivement $K_M = 43,0$ et $K_M = 34,5$. L’affinité de l’émulsine d’Amande-amère pour le salicoside est de 33,0 avec 18 mg. de préparation et de 36 avec 46 mg. ; vis-à-vis de l’arbutoside $K_M = 24$ avec 18 mg. d’émulsine contre $K_M = 22$ avec 71 mg. JOSEPHSON [120].

Sur les conseils de P. FLEURY nous avons calculé l’affinité de la laccase pour le gaïacol ; en utilisant les données expérimentales de P. FLEURY [75] à pH 6,7 et + 30° $K_M = 31,6$, 30,5 et 31,6 pour 1-5 et 10 mg. de poudre fermentaire. Ces résultats sont d’autant plus nets du fait que les expériences avaient été réalisées dans un but tout différent.

2. *Purification de la diastase.*

KUHN [138] a montré que l’affinité des préparations de sucrase d’une même levure est indépendante de la pureté et partant de l’activité de la préparation. L’autolysat initial et une préparation deux cents fois plus active à poids égal ont même affinité ($K_M = 34,4$) vis-à-vis du saccharose.

L’addition de suc de levure inactivé par la chaleur ne modifie pas l’affinité de la sucrase de la même levure EULER et LAURIN [70], mais modifie celle d’une autre levure KUHN [138]. Ces faits ne sont pas généralisables à

toutes les diastases ; la purification diminue l'affinité de la phosphatase rénale, H. et E. ALBERS [2], les solutions troubles de phosphatase de Pomme de terre ont une plus grande affinité que les solutions limpides PFANKUCH [173]. Les données expérimentales de KUTSCHER et WÖRNER [144] nous ont permis de calculer que le vieillissement qui diminue nettement l'activité de la phosphatase de la prostate fait croître de 32 à 64 son affinité pour le β glycérophosphate.

B. — FACTEURS MODIFIANT L'AFFINITÉ.

1. *Le pH.* — L'affinité de la sucrase de la levure de boulangerie vis-à-vis du saccharose est constante de pH 3,7 à 9,0, MICHAELIS et ROTHSTEIN [154]. EULER et LAURIN [70], puis KUHN [138], avec des levures différentes, observèrent également que l'affinité de la sucrase était indépendante du pH. La plupart des traités d'enzymologie généralisèrent hâtivement ce fait. Une bibliographie plus approfondie de la question et nos recherches personnelles nous ont au contraire montré que l'affinité d'une diastase vis-à-vis d'un substrat variait presque toujours avec le pH. Le premier, JOSEPHSON [119] montra que l'affinité de la sucrase de levure variait avec le pH dans la zone fortement acide ; vis-à-vis du saccharose K_M croît de 22 à pH 2,63 à 35 à pH 2,77 et 54 à pH 4,5. L'affinité de la β glucosidase de l'émulsine vis-à-vis du salicoside varie également avec le pH : $K_M = 28,5$ pour pH 4,4 contre $K_M = 21$ à pH 6,8, KUHN et SOBOTKA [139] ; et $K_M = 23$ (pH 2,8), $K_M = 32$ (pH 4,4), $K_M = 22$ (pH 6,5), JOSEPHSON [120].

BAMANN et RENDLEN [16] ont signalé que l'affinité de l'estérase hépatique vis-à-vis du succinate et de l'adipate acides d'éthyle et des amines correspondantes variait avec le pH. L'affinité de la phosphatase rénale pour le β glycérophosphate croît régulièrement de 222 à pH 10,0 à 20.000 pour pH 8,5 JACOBSEN [111]. L'affinité de la phosphatase mammaire pour le phénylphosphate aug-

mente également de pH 10,0 à pH 8,9 FOLLEY et KAY [82].

Afin de compléter ces données bibliographiques, nous avons calculé l'affinité de la laccase pour le gaïacol d'après les expériences de P. FLEURY [75]. Nous avons ainsi constaté que cette affinité croissait avec l'alcalinité comme le prouvent les chiffres suivants :

pH.....	4.5	6.3	6.7	7.1	7.6	8.4	9.0
K _M	7.9	28.5	31.5	39.5	100.0	224	446

L'affinité de l'uréase du Soja croit également avec le pH comme nous avons pu le calculer d'après les données de BARENDRECHT [23].

pH.....	5.8	6.68	6.81	6.9	7.14	7.47
K _M	3.5	28.2	41.6	50.0	120.0	355.0

Une expérience de LÖVGREN [147] réalisée avec l'uréase du Soja à pH 6,96 donne K_M = 56,0 ce qui concorde avec les valeurs déduites des expériences de BARENDRECHT.

Nous pouvons ainsi constater que, contrairement à l'opinion généralement admise, l'affinité d'une diastase vis-à-vis d'un substrat varie avec le pH.

2. *La température.* — EULER et LAURIN [70] ont trouvé comme affinités de la sucrase de levure vis-à-vis du saccharose ; K_M = 47,6 à 10° contre 40 à 15°, 38,4 à 25° et 31,2 à 39°.

En admettant par hypothèse que la chaleur de dissociation Q ne varie pas avec la température absolue T, EULER et LAURIN ont montré que les variations de la constante de MICHAELIS K_m en fonction de T concordent avec l'équation de GIBBS en utilisant le mode de présentation proposé par LE CHATELIER :

$$Q = - R T^2 \frac{d \ln K_m}{dT (dT)}$$

3. *L'origine de la diastase.* — Les premières recherches ont porté sur la sucrase de levure ; travaillant avec des souches de levure différentes MICHAELIS et MENTEN [153], EULER et LAURIN [70], KUHN [138] trouvèrent des

valeurs différentes de l'affinité vis-à-vis du saccharose. Ces faits furent ensuite généralisés à d'autres diastases : β glucosidases d'Abricot et d'Amande douce ou amère vis-à-vis des β -méthyl et β -phényl glucosides ou du salicoside WISSTÄTTER et KUHN [214] ; α glucosidases de levures diverses vis-à-vis du maltose et des α méthyl et α phényl-glucosides WILLSTÄTTER, KUHN et SOBOTKA [216]. Ces faits ont été étendus également aux lipases et estérases puis aux phosphatases ; dans le tableau I nous avons groupé les valeurs obtenues avec ces diastases.

4. *La nature du substrat.* — Les constantes de dissociation électrolytique différentes de sels à anions semblables et cations dissemblables ou vice versa permettaient de supposer que les constantes de MICHAELIS d'une même diastase vis-à-vis de substrats différents seraient dissemblables ; l'expérience a confirmé ces prévisions. Le premier, KUHN [138] observa que les fructosidases de levures de souches différentes présentaient toujours une plus grande affinité vis-à-vis du saccharose que vis-à-vis du raffinose ; les valeurs absolues de ces affinités étant par ailleurs variables selon l'origine de la levure. Ces faits ont été étendus aux diastases les plus diverses : glucidases, lipases et estérases, déshydrogénases etc.. Les expériences portent en général sur un petit nombre de substrats assez différents ; il n'est pas encore possible de relier les variations d'affinité et la constitution chimique du substrat. Cependant BAMANN et RENDLEN [16] ont montré que la présence d'un carboxyle au voisinage de la liaison ester diminuait l'affinité. L'estérase hépatique présente une plus grande affinité vis-à-vis de l'adipate acide d'éthyle que vis-à-vis du succinate acide d'éthyle ; il en est de même vis-à-vis des deux amides correspondantes ; l'affinité pour l'ester amide étant toujours plus élevée que pour l'ester acide. Le radical C_6H_5 diminue également l'affinité qui croît avec la longueur de la chaîne carbonée le séparant de la fonction ester MURRAY et KING [158].

TABEAU I.
Affinité des diverses phosphatases.

Origine du ferment	Type de phosphatase (selon FOLLEY et KAY)	Substrat	pH	Température	Affinité K _m	Référence
Os	A ₁	β glycéro-phosphate	8,2	38°	> 330	MARTLAND et ROBISON [451]
Rein de Porc	A ₁	β glycéro-phosphate	8,5	39°	20000	JACOBSEN [409]
id.	A ₁	id.	8,7	39°	10000	id.
id.	A ₁	id.	10,0	39°	222	FOLLEY et KAY [82]
Glande mammaire (Cobaye)	A ₁	phényl-phosphate	8,9	37°	10000	id.
id.	A ₁	id.	10,0	37°	1666	id.
Rein (Cobaye)	A ₁	phényl-phosphate	10,0	37°	1666	GIRI et DATTA [89]
Cerveau (Mouton)	A ₁	β glycéro-phosphate	9,2	35°	83,3	KUTSCHER et WÖRNER [444]
Prostate (Homme)	A ₂	id.	4,65	37°	32,0	GIRI [87]
Salive (Homme)	A ₂	id.	5,00	37°	> 19	GIRI et DATTA [89]
Cerveau (Mouton)	A ₂	id.	5,0	35°	34,5	PFANKUCH [473]
Pomme de terre	A ₂	id.	5,85	30° (1)	50	id.
id.	A ₂	id.	5,85	30°	55,5	id.
id.	A ₂	id.	5,85	30°	90,0	id.
id.	A ₂	id.	5,85	30°	71,0	id.
id.	A ₂	id.	5,85	30°	345	GIRI [88]
id.	A ₂	id.	5,2	35°	11	KOBAYASHI [432]
id.	A ₃	id.				

(1) Echantillons de diverses origines.

AFFINITÉ ET POUVOIR FIXATEUR.

Nous avons défini (page 31) le pouvoir fixateur : cette caractéristique des diastases est tout à fait indépendante de l'affinité, ces deux caractéristiques variant d'une façon différente.

1. *Le pouvoir fixateur peut demeurer constant lorsque l'affinité est variable.* — Si on oppose à des doses équimoléculaires constantes de raffinose ou de saccharose des quantités croissantes de β h. fructosidase de levure la vitesse de réaction devient à la fois maxima et constante pour des doses égales de la même préparation diastasi-que. En d'autres termes ces deux substrats ont des pouvoirs fixateurs identiques, COLIN et Mlle CHAUDUN [47]. KUHN [138] ayant montré par ailleurs que les affinités de divers autolysats de levure sont toujours plus élevées vis-à-vis du saccharose que vis-à-vis du raffinose, nous pouvons en déduire que pour des substrats vis-à-vis desquels la diastase possède des affinités différentes elle présente par contre des pouvoirs fixateurs égaux. L'étude de la β glucosidase d'Amande permet de tirer la même conclusion : les pouvoirs fixateurs de l'émulsine vis-à-vis du méthylglucoside et du salicoside sont égaux, COLIN et Mlle CHAUDUN [49] bien que cette diastase présente des affinités différentes pour ces deux substrats, WILLSTÄTTER et KUHN [214].

2. *Le pouvoir fixateur peut varier lorsque l'affinité reste constante.* — L'affinité de la sucrase de levure pour le saccharose est indépendante du pH (page 38) tandis que le pouvoir fixateur varie selon la réaction du milieu, COLIN et Mlle CHAUDUN [48].

AFFINITÉ ET VITESSE MAXIMA D'HYDROLYSE.

La vitesse maxima d'hydrolyse correspond à la vitesse de transformation du substrat par une diastase saturée de ce dernier. Cette autre caractéristique des diastases se montre totalement indépendante de l'affinité : les

diverses possibilités résultant de la combinaison des deux facteurs différents et indépendants ont été observées.

1. *Affinités égales, vitesses de décomposition différentes.* — L'estérase du pancréas de Porc présente des affinités égales pour les d. et l. mandélates d'éthyle, mais hydrolyse plus rapidement le stéréoisomère l., WEBER et AMMON [210].

2. *Affinités différentes, vitesses de décomposition égales.* — La levure qui fait fermenter à des vitesses égales le glucose et le fructose, attaque le glucose de préférence dans un mélange des deux sucres, vraisemblablement parce qu'elle présente une plus grande affinité pour le glucose, WILLSTÄTTER et SOBOTKA [220]. De même les α et β glucoses fermentent à des vitesses égales, l' α étant attaqué de préférence dans le mélange des stéréoisomères, WILLSTÄTTER et SOBOTKA [220].

3. *Affinités et vitesses de décomposition différentes.* — L'estérase hépatique réagissant sur le mandélate d'éthyle racémique libère un mélange des deux acides actifs où l'isomère droit prédomine, mais, contre toute attente, cette diastase réagissant sur les deux stéréoisomères séparés attaque plus rapidement la forme l., WILLSTÄTTER et MEMMEN [217]. WILLSTÄTTER, KUHN et BAMANN [215] interprétèrent ce comportement paradoxal en dissociant les deux facteurs affinité et vitesse maxima.

L'estérase présente une affinité trois fois plus grande vis-à-vis du l. ester que du d. et, réagissant sur le racémique, se fixe de préférence sur la forme d. qui est presque seule hydrolysée. Par contre l'estérase hydrolyse le l. ester avec une vitesse maxima 1,6 fois supérieure à celle du d. Il en résulte donc qu'en opposant à une dose constante d'estérase des doses croissantes de substrat racémique l'acide libéré est dextrogyre aux basses concentrations en substrat, zone où le rôle de l'affinité est prépondérant. Lorsque la concentration du substrat augmente le pouvoir rotatoire de l'acide mandélique libéré diminue progressivement car l'importance

du facteur affinité diminue simultanément. Enfin, aux fortes concentrations en substrat, le rôle de la vitesse de décomposition devient prédominant et le mélange des acides libérés est faiblement lévogyre.

Avec P. DENIS [59] nous avons pu interpréter d'une façon similaire l'action de la taka-diastrase sur deux isomères de position : les propylphosphates. L'affinité de la phosphatase est plus grande vis-à-vis de l'isopropylphosphate que vis-à-vis de son isomère ; inversement le n. propylphosphate possède une vitesse maxima d'hydrolyse plus élevée que l'isopropylphosphate.

4. *Action des inhibiteurs sur ces deux facteurs.* — En dehors des inhibiteurs qui inactivent irréversiblement la diastase, les autres inhibiteurs peuvent se classer en deux catégories : a) les inhibiteurs *concurrents* (« *competitive inhibitors* » des anglo-saxons) qui tendent à déplacer par action de masse le substrat fixé sur la diastase ; ces inhibiteurs possèdent donc une certaine affinité pour la diastase et, en vertu de la loi d'action de masse, l'inhibition est proportionnelle à la fois au rapport des affinités respectives : diastase-substrat/diastase inhibiteur et au rapport substrat/inhibiteur. L'action inhibitrice concurrente se caractérise donc par le fait que, pour des doses constantes de diastase et d'inhibiteur, l'inhibition est inversement proportionnelle à la concentration du substrat. Cette forme d'inhibition est donc accompagnée d'une *diminution apparente* de l'affinité de la diastase pour le substrat ; le phénomène est analogue au recul d'ionisation des électrolytes. b) les inhibiteurs *absolus* diminuent la vitesse maxima de réaction ; ces inhibiteurs ne modifient pas l'affinité et le pourcentage d'inhibition est indépendant de la concentration en substrat.

Un certain nombre d'inhibiteurs agissent d'ailleurs selon ces deux mécanismes et se comportent à la fois comme des inhibiteurs concurrents et des inhibiteurs absolus comme par exemple les phosphates vis-à-vis des phosphatases.

En règle générale les produits de la réaction diastatique et les corps ayant une constitution chimique voisine, soit de celle du substrat, soit de celles de ses produits de transformation, interviennent comme inhibiteurs concurrents. Par un raisonnement déduit de la loi d'action de masse il est possible de calculer la valeur de la dissociation de la combinaison inhibiteur concurrent-diastase.

Relations entre l'affinité et la nature de la combinaison diastase-substrat.

CONSTITUTION DES DIASTASES.

L'hypothèse initiale de G. BERTRAND [31] modifiée par divers auteurs, WILLSTÄTTER [212], KRAUT et PANTSCHENKO-JUREWICZ [136], sur la constitution des diastases est à peu près généralement admise aujourd'hui : La diastase totale ou *holo-diastase* résulte de la combinaison d'un groupe doué de l'activité catalytique : la *co-diastase* (1) à un support colloïdal catalytiquement inactif l'*apo-diastase* protégeant, développant et multipliant l'activité catalytique de la co-diastase. La liaison co-diastase - apo-diastase s'effectuerait par des valences secondaires et serait du type des *symplexes* de WILLSTÄTTER.

Les apo-diastases se comportent d'une façon assez générale comme des protides ; les co-diastases ont par contre des constitutions assez variables (2) (métaalloporphyrines, nucléotides, dérivés des vitamines, etc.).

(1) Le terme co-diastase a été proposé par G. BERTRAND dès 1897 (*Bull. Soc. Chim. France*, 1897, **17**, 619).

(2) Nous ne développerons pas cette question en voie d'évolution continuelle qui sort du cadre de notre travail ; des revues et conférences traitant le problème de la constitution des diastases ont paru ou vont paraître : Conférences de KUHN, KEILIN, NORTHROP et WARBURG dans le Compte-rendu du Congrès du Palais de la découverte, revues de P. FLEURY dans les *Actualités biologiques médicales* et de J. COURTOIS dans la *Pharmacie Française*, 1938, n^{os} 3, 4 et 5, revue de O. WARBURG, *Erg. Enzymforsch.*, 1938, **7**, 210.

LA THÉORIE DE LA DOUBLE AFFINITÉ.

L'holo-diaстase résulte de la juxtaposition de deux éléments distincts, il est permis de se demander si la combinaison diaстase-substrat dont la constante de MICHAELIS exprime la dissociation correspond à une combinaison apo-diaстase-substrat ou à une combinaison co-diaстase-substrat. Il est vraisemblable que les deux combinaisons peuvent se réaliser, c'est la base de la théorie de la double affinité d'EULER ; pour qu'un substrat soit transformable il faut :

- 1° qu'il puisse se fixer sur l'apo-diaстase ;
- 2° qu'il fasse partie du champ d'action catalytique de la co-diaстase.

Il existe en effet un certain nombre de composés qui peuvent se fixer sur l'apo-diaстase et ne pas être transformés par la co-diaстase, ce sont les inhibiteurs concurrents. La plupart des amines et phénols à noyau benzénique sont des inhibiteurs concurrents de la peroxydase, mais seuls ceux susceptibles d'être transformés en quinones sont oxydables, BALLS et HALE [12]. Les dérivés méthylés et éthylés de l'acide urique non transformables inhibent concurremment l'oxydation sélective de l'acide urique en allantoine par l'uricase de KEILIN [127].

Si des substances présentant de nettes analogies chimiques avec le substrat sont fixées par l'apo-diaстase mais ne sont pas transformées par la co-diaстase il arrive inversement que des substances possédant une liaison chimique transformable par la co-diaстase ne sont pas fixées sur l'apo-diaстase et de ce fait ne sont pas transformées par la co-diaстase. Toutes les peptidases rompent une liaison amide ; mais tandis que les carboxypolypeptidases ne peuvent fixer et par suite hydrolyser que les peptides possédant un carboxyle libre, les aminopolypeptidases, par contre, ne peuvent fixer et hydrolyser que les polypeptides possédant une

fonction amine libre, WALDSCHMIDT-LEITZ [209]. Les lipases qui rompent une liaison éther-sel présentent une affinité nulle ou infime pour les esters possédant une fonction acide libre au voisinage de la liaison ester ; ces corps n'étant que peu ou pas fixés ne sont que peu ou pas hydrolysés, BAMANN, SCHWEIZER et SCHMELLER [22], BAMANN et RENDLEN [16]. Il apparaît donc que la combinaison diastase-substrat dont l'affinité exprime la stabilité est en réalité une combinaison de l'apo-dia-
tase et du substrat qui seraient unis par les forces d'adsorption. Divers faits viennent en effet étayer cette conception :

a) Les variations de la vitesse de réaction en fonction de la concentration du substrat présentent de nettes analogies avec les isothermes d'adsorption de FREUNDLICH reliant le pourcentage d'adsorption à la concentration de la substance adsorbable, HEDIN [92, 93], HITCHCOCK [98], SCHWAB, WEIDENHAGEN et LANG, WEIDENHAGEN et TODT [85], RONA et AMMON [187], EADIE [64].

b) L'acide cyanhydrique inhibe considérablement la décomposition du peroxyde d'hydrogène par la catalase hépatique ; cet inhibiteur ne modifie pas l'affinité de cette diastase pour l'eau oxygénée, EULER et JOSEPHSON [71] ; le nitrile se fixe par contre sur le groupe actif hémine de la catalase pour donner une combinaison dont le spectre d'absorption est analogue à celui de la cyano-hématine, ZEILE et HELLSTRÖM [223]. Le monoéthylperoxyde d'hydrogène est un inhibiteur concurrent de la catalase, STERN [201] et se fixe également sur le groupe hémine pour donner une combinaison caractéristique (page 31). Tout se passe donc comme si l'acide cyanhydrique s'unissait uniquement à la co-dia-
tase et, ne modifiant pas l'affinité, ne se fixait pas sur l'apo-dia-
tase. Avec R. TRUHAUT [60] nous avons proposé d'interpréter la réaction catalase-monoéthylperoxyde d'hydrogène étudiée spectroscopiquement par STERN [202] en utilisant la théorie de la catalyse hétérogène des réac-

tions diastasiques proposée par FRANKENBURGER [85].

Il est possible de distinguer sept stades successifs dans la réaction :

1° Transport du substrat à la surface du catalyseur.

2° Adsorption physique du substrat ; la constante de MICHAELIS exprime la dissociation de cette combinaison. Dans la réaction étudiée par STERN ce stade s'accompagne de la disparition du spectre de la catalase libre.

3° Migration de la substance adsorbée à l'intérieur de la couche d'adsorption vers les pointes actives de la surface.

4° Transformation du substrat en une forme active et pouvant réagir par les pointes actives de la co-dias-tase. A ce stade apparaît la combinaison rouge à spectre caractéristique ; hémine de la catalase-monoéthylperoxyde.

5° Permutation des produits de décomposition de la co-dias-tase à la surface de l'apo-dias-tase où ils peuvent exercer dans certains cas une action inhibitrice concurrente.

6° Elution des produits de la réaction du voisinage de la limite de la surface catalysante.

Certaines de nos expériences nous ont donné des résultats conformes à la conception qui considère l'affinité comme représentant la stabilité de la combinaison apo-dias-tase du substrat. Nous reviendrons sur ces faits au cours de notre exposé.

Conclusions du chapitre II.

Il est très vraisemblable qu'au cours de la réaction diastasique le substrat est adsorbé sur le support colloïdal de la diastase au apo-dias-tase ; il est ensuite transformé par le groupe actif ou co-dias-tase.

La combinaison apo-dias-tase - substrat est dissociée et sa stabilité est mesurée par l'affinité K_M ; cette affi-

nité, indépendante de la concentration en substrat, varie avec le pH, la température et, dans certains cas, la pureté de la diastase. L'affinité pour le substrat est fonction de l'origine de la diastase ; une même diastase présente en outre des affinités différentes pour des substrats différents. L'affinité est indépendante du pouvoir fixateur et de la vitesse avec laquelle la co-diastrase est susceptible de dégrader catalytiquement le substrat. Les inhibiteurs des réactions diastasiques se différencient en : inhibiteurs *concurrents* qui, possédant une certaine affinité pour l'apo-diastrase, tendent à en déplacer le substrat adsorbé et inhibiteurs *absolus* qui diminuent la réactivité catalytique de la co-diastrase.

CHAPITRE III.

TECHNIQUES ANALYTIQUES.

L'activité des phosphatases a été estimée en dosant l'un ou l'autre des produits de l'hydrolyse des glycérophosphates : acide orthophosphorique et glycérol.

Nous envisagerons successivement le protocole général des expériences d'hydrolyse puis le dosage de ces deux éléments.

Protocole général des expériences d'hydrolyse.

a) *Diastases*. — Comme source de taka-diastrase nous avons utilisé la préparation fermentaire pulvérulente délivrée par la firme PARKE-DAVIES. Cette poudre, très soluble dans l'eau, a été utilisée en dissolutions aqueuses préparées au moment de l'emploi. Pour les phosphatases de graines nous avons employé les macérations pendant dix jours d'une partie de poudre de graines dans dix parties d'eau toluénée. Afin d'obtenir une certaine quantité de préparation diastasique homogène nous avons traité ces solutions extractives par trois parties d'alcool à 90° ; le précipité formé est recueilli, lavé à l'alcool et desséché jusqu'à poids constant dans le vide sulfurique. Les rendements par kilog de matière première varient selon les graines utilisées : 36 g. avec la Moutarde blanche, 51 g. avec la noire, 4 g., 10 avec le Pavot blanc. Ces préparations ont été utilisées sous forme de suspensions à 1 p. 100 obtenues par agitation mécanique dans l'eau bi-distillée stérile additionnée de 0,5 p. 100 de toluène. Ces suspensions peuvent être conservées à la glacière

pendant une semaine. Comme préparation de phosphatase d'Amande douce nous avons eu recours à l'émulsine obtenue par la technique de HÉRISSEY [95].

b) *Substrats*. — Nous avons utilisé le β glycérophosphate disodique cristallisant avec 5 OH_2 ; ce sel a été purifié par recristallisation du glycérophosphate de sodium solide du commerce. Depuis deux à trois ans les sels commerciaux renferment des quantités appréciables d' α glycérophosphate qu'il est possible d'éliminer presque totalement par trois ou quatre cristallisations fractionnées. Nous avons utilisé des β glycérophosphates ne renfermant pas plus de 3 à 4 p. 100 de sel α , dosé par la technique à l'acide periodique de P. FLEURY et PARIS [79].

D'autre part nous avons eu recours au d. l. α glycérophosphate disodique à 6 OH_2 (1) de CHARPENTIER et BOCQUET [43], sel dont la pureté a été appréciée par la même technique. Les solutions de glycérophosphates ont été ajustées au pH désiré par addition d'acide citrique ; nous obtenons ainsi des mélanges tampons dont le pH ne varie pas sensiblement par hydrolyse diastasique partielle ; en effet les acides glycérophosphoriques sont plus fortement dissociés que l'acide orthophosphorique et la libération d'orthophosphates tend à alcaliniser le milieu. Pour cette raison, lorsque nous avons mesuré des pourcentages d'hydrolyse élevés ou encore utilisé de faibles concentrations en substrat, le pH du milieu a été stabilisé par des solutions tampons : phtalate acide de potassium-acide chlorhydrique ou soude, acide citrique-soude, glycine-soude.

Dosage de l'acide orthophosphorique.

Cet acide a été dosé par la technique de COPAUX [52] : engagement dans un complexe aquéo-éthéro-phospho-

(1) Les quantités importantes de ce sel consommées au cours de nos recherches nous ont été aimablement fournies soit par M. le Professeur DELÉPINE, soit par M. Octave BAILLY auxquels nous sommes heureux de témoigner notre respectueuse gratitude.

duodécimolybdique, liquide plus dense que l'eau se collectant par centrifugation dans la douille graduée d'ampoules spéciales. Dans le mélange réactionnel le dosage direct est impossible même après déprotéinisation. Les solutions diastasiques contiennent des substances azotées de faible poids moléculaire, qui, dans les conditions opératoires de COPAUX, donnent un précipité amorphe de phosphomolybdates d'amines ; l'isolement préalable de l'acide phosphorique sous forme de sel ammoniacomagnésien cristallisé permet d'éliminer ces impuretés. Nous avons finalement adopté la technique suivante : le mélange réactionnel est débarrassé de la majeure partie des protéines par chauffage de trente minutes sur un bain-marie bouillant avec 30 cm³ de mixture magnésienne (formule TREADWELL) et 10 cm³ d'un mélange à volumes égaux d'acide acétique et d'acétate d'ammonium officinal. Après filtration, le liquide et les eaux de lavage sont alcalinisés à la phtaléine par addition d'ammoniaque ; le phosphate ammoniacomagnésien précipité après 24 heures de repos est isolé et lavé à l'eau ammoniacale. Le sel adhérent aux parois du flacon ou séparé sur le filtre est dissous dans 30 cm³ d'eau et 5 cm³ d'acide nitrique ; la solution nitrique est introduite dans l'ampoule de COPAUX. Selon la dose de phosphore nous avons utilisé soit les ampoules normales graduées en 1/20° de cm³, soit celles graduées en 1/40° et 1/100° de cm³ utilisées par Mme HINGLAIS [97], puis M. JAVILLIER et ses autres élèves [115] dans leurs microdosages de phosphore.

La teneur en acide phosphorique est calculée après soustraction de la quantité libérée dans une expérience témoin ; l'hydrolyse du substrat est pratiquement nulle et le témoin donne la teneur en phosphore minéral de la préparation fermentaire, faible ou nulle pour les phosphatases de graines, assez importante pour la takadiastase. Avec cette dernière diastase, pauvre en protides, la défécation préliminaire est inutile et on peut

procéder directement à la précipitation ammoniaco-magnésienne.

Dans certaines expériences en présence d'inhibiteurs nous avons dû modifier quelque peu cette technique ; en présence de sels d'alcaloïdes les bases insolubilisées en milieu ammoniacal sont éliminées en lavant le précipité de phosphate ammoniaco-magnésien avec de l'alcool à 95° puis du chloroforme.

L'acide arsénique donne dans les conditions opératoires de COPAUX un précipité de complexe liquide aquéo-éthéro-arséniato-duodécimolybdique, J. COURTOIS [57]. En présence d'arséniates nous avons utilisé une technique décrite dans une publication séparée, J. COURTOIS [58] et dont nous rappelons brièvement le principe : l'acide arsénique est réduit par l'acide iodhydrique selon la technique de P. FLEURY [74] l'iode libéré est neutralisé par l'hyposulfite ; l'acide phosphorique est alors précipité sous forme de sel ammoniaco-magnésien, redissous dans l'acide sulfurique pour éviter l'oxydation des arsénites qui précipitent en petite quantité en présence de mixture magnésienne.

Dosage du glycérol.

Ce polyol a été dosé soit pour confirmer le dosage de l'acide phosphorique soit pour évaluer l'hydrolyse en présence de fortes doses de phosphates. Nous avons employé la technique de P. FLEURY et FATOME [77] : deux molécules d'acide periodique oxydent le glycérol en deux molécules de formol et une d'acide formique ; l'acide periodique non réduit est déterminé en utilisant son action oxydante sur une solution titrée d'anhydride arsénieux, dont l'excès est dosé par l'iode N/10.

L'acide periodique oxyde d'une façon générale les α -glycols et en particulier les glucides, P. FLEURY et LANGE [78] ; la taka-diastase riche en substances glucidiques consomme des quantités élevées d'acide perio-

dique. La réaction lente et irrégulière n'est complète qu'après 48 heures à $+ 20^{\circ}$; nous avons tenu compte de cette cause d'erreur au cours de nos dosages.

D'autre part l' α glycérophosphate possédant une fonction α -glycol est oxydé par une molécule d'acide périodique en formol et ester phosphorique de l'aldéhyde glycolique, P. FLEURY et PARIS [79]. Il en résulte que l'hydrolyse de l' α glycérophosphate ne libère qu'une fonction glycol- α tandis que celle du β glycérophosphate en libère deux. Si nous désignons par x la concentration moléculaire de l' α glycérophosphate hydrolysé, y celle du β , a celle de l'orthophosphate libéré et b celle des fonctions α -glycol mises en liberté, nous avons deux équations permettant de calculer x et y :

$$(1) \quad x + y = a$$

$$(2) \quad x + 2y = b$$

Nous avons utilisé cette technique indirecte pour estimer les pourcentages d'hydrolyse respectifs des deux glycérophosphates mélangés.

DEUXIÈME PARTIE.

Etude de la taka-diastrase.

INTRODUCTION.

La taka-diastrase de l'*Aspergillus orizae* constitue avec les levures et les reins de Mammifères la source de phosphatase la plus couramment utilisée. La taka-diastrase hydrolyse un grand nombre de dérivés organiques phosphorés ; les α et β glycérophosphates sont les monoesters les plus souvent utilisés comme substrats ; les résultats obtenus sont d'ailleurs assez différents surtout au point de vue du pH optimum et de la spécificité d'action sur les deux isomères.

a) *pH optimum.* — Les valeurs obtenues pour le pH optimum s'étagent entre 3 et 6 ; selon INOUE [106] le pH optimum est fonction de la pureté de la diastase ; la taka-diastrase purifiée par adsorption a un pH optimum vers 3,0 ; cette purification débarrasse la diastase d'une substance inconnue, précipitable par le plomb, « le corps X ». L'addition de ce corps à la diastase purifiée ralentit la vitesse de réaction et déplace le pH optimum de 3,0 vers 5,6 ; ces deux actions sont proportionnelles à la dose de corps X ajouté.

b) *Spécificité d'action.* — Le pH optimum d'hydrolyse des deux glycérophosphates est différent et d'autre part le rapport des vitesses d'hydrolyse varie avec le pH.

ASAKAWA [6] a observé qu'à pH 3,0 le β glycérophos-

phate était hydrolysé plus rapidement que l' α mais à pH 5,5 les deux formes sont dédoublées à des vitesses égales. Par contre KAY et LEE [126] ont observé une hydrolyse plus rapide de la forme β , ceci quel que soit le pH. Dans des recherches antérieures [54] nous avons retrouvé le même fait ; nous avons en outre constaté que le pH optimum du β glycérophosphate se plaçait vers 3,8-4,0 contre 4,6-4,8 pour l' α (dont le maximum est assez peu saillant). CONTARDI et ERCOLI [50], utilisant une solution d' α glycérophosphate de 12 p. 100 plus concentrée en phosphore organique que celle de β , ont observé qu'à pH 5,3 la quantité de phosphore minéral libérée par l' α glycérophosphate était un peu supérieure à celle libérée par le β , ces quantités étant sensiblement égales à pH 5,5. Enfin NEUBERG et SCHUCHARDT [166] placent vers 4,0 le pH optimum d'hydrolyse des deux formes, le β étant hydrolysé le plus rapidement quel que soit le pH.

Alors que nous avons déjà pris date pour certains des résultats exposés dans ce chapitre [55, 56], BAMANN et SALZER [20] ont publié un certain nombre d'expériences permettant de relier ces diverses données contradictoires. La taka-diastrase serait un mélange en proportions variables de phosphatases A_2 et A_3 ; la phosphatase A_3 , fortement inactivée par les fluorures, est détruite par contact à pH 8,0-8,2 avec une solution ammoniacale ; elle hydrolyse le β glycérophosphate plus rapidement que l' α . La phosphatase A_2 , par contre, est peu sensible à l'action inhibitrice fluorée, stable à pH 8,0 et hydrolyse l' α glycérophosphate un peu plus rapidement que le β . La phosphatase A_3 est inhibée par le corps X ; l'acide citrique fait disparaître presque totalement cette action inhibitrice ; d'autres acides alcools et même des acides α cétoniques présentent cette propriété (acides malique, glycolique, lactique, glycérique, gluconique, benzoylformique et pyruvique), BAMANN et SALZER [21]. L'acide citrique augmente non seulement

l'activité des préparations brutes de taka-diaستase présentant un seul optimum vers pH 4,0 mais encore des préparations purifiées par dialyse sur membrane, électrodialyse ou adsorption sur kaolin qui possèdent deux pH optima vers 3,2-3,7 et 5,0-5,5. Toutes nos expériences ont été réalisées en présence de tampons à l'acide citrique ce qui fait que pratiquement nous avons étudié la seule phosphatase A_3 de pH optimum 4,1. Dans le but de rechercher si les α et β glycérophosphates étaient dédoublés par la même diastase nous avons étudié l'influence de différents facteurs sur l'hydrolyse des deux esters : pH, concentration du substrat et de la diastase, action des divers composés chimiques, du vieillissement. Nous avons observé que ces divers facteurs influaient également sur l'hydrolyse des deux isomères qui semblent dédoublés par une même diastase. La plus grande rapidité de transformation de la forme β a pu être rapportée à une plus forte affinité de la diastase pour ce substrat que pour son isomère, cette plus forte affinité étant par ailleurs accompagnée d'une plus grande vitesse d'hydrolyse maxima.

I. — INFLUENCE DE LA DURÉE DE LA RÉACTION SUR L'HYDROLYSE DES DEUX GLYCÉROPHOSPHATES.

Nous avons réalisé les expériences décrites dans le tableau II en utilisant soit des solutions pures des deux isomères, soit en leur ajoutant l'un ou l'autre des deux corps libérés par hydrolyse. Nous pouvons formuler diverses observations :

1. Dans tous les cas le β glycérophosphate est hydrolysé plus rapidement que son isomère ; l'écart est particulièrement net en présence de fortes doses de phosphates, ce qui peut être interprété par la plus grande affinité de la taka-diaستase pour le β glycérophosphate. Comme nous l'avons établi par la suite, cette plus forte affinité diminue la valeur de l'action inhibitrice concurrente des phosphates.

TABLEAU II.

Solution M de glycérophosphate..... 5 cm³
 Solution N d'acide citrique..... 10 cm³
 Taka-diasase à 1 o/o..... 20 cm³
 Glycérol ou PO₄KH₂ pH 4,4..... variable
 Eau distillée, q. s..... 125 cm³

Durée d'hydrolyse en heures	Pourcentage d'hydrolyse										Constante des réactions mono- moléculaires					
	témoin		Concentration moléculaire du glycérol				Concentration moléculaire du phosphate monopotassique									
			0,04		0,2		0,4		0,02			0,1		0,2		
			α 100 ^{0/10}	β 50 ^{0/10}	α 50 ^{0/10}	β 100 ^{0/10}	α 100 ^{0/10}	β 50 ^{0/10}	α 50 ^{0/10}	β 100 ^{0/10}		α 100 ^{0/10}	β 50 ^{0/10}	α 50 ^{0/10}	β 100 ^{0/10}	
6	19	33	36,6	19	36,6	38,0	19	33,7	9	28	4,75	11,2	1,25	7,0	42,3	91,6
24	49,3	63,0	84,5	47,8	81	78,5	46	60	25	70	12,5	48,0	2,5	20	34,1	93,7
48	70,4	84,5	93,0	70,4	84,5	84,5	60	79	—	—	—	—	—	—	30,5	66,8
72	82,5	—	97,5	—	—	—	—	—	57,5	88,0	32,5	65,0	5,0	62,0	29,2	61,5

(1) $K = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$

α quantité du substrat de concentration initiale a hydrolysé après un temps t d'hydrolyse,
 t en secondes, log décimaux

2. Cette plus forte affinité vis-à-vis du β se manifeste encore par le fait que dans un mélange équimoléculaire des deux isomères le pourcentage d'hydrolyse se rapproche beaucoup plus de celui du β que de celui de l' α .

3. La réaction ne suit pas la loi des réactions monomoléculaires, les phosphates libérés inhibant l'hydrolyse des glycérophosphates ; le glycérol, par contre, n'exerce qu'une action inhibitrice très faible ou nulle même à des concentrations moléculaires dix fois supérieures à celles des substrats. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par d'autres auteurs avec les phosphatases les plus diverses (page 18).

II. — INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DU SUBSTRAT SUR LE pH OPTIMUM D'HYDROLYSE.

Dans cette série d'expériences nous avons fait varier la concentration en substrat et le pH, la température et la concentration en diastase demeurant constantes. La durée d'hydrolyse a été choisie approximativement de telle sorte que le pourcentage d'hydrolyse du substrat n'excède pas 10 p. 100. Dans ces conditions nous mesurons la vitesse initiale de la réaction, le pourcentage d'hydrolyse est à peu près directement proportionnel à la durée de réaction pour deux causes distinctes :

1. La réaction suit la loi des réactions monomoléculaires et dans l'équation de WILHEMY $K = \frac{1}{t} \log \left[\frac{a}{a-x} \right]$, l'influence du second membre est restreinte, x demeurant petit devant a .

2. L'action inhibitrice concurrente du phosphate libéré demeure infime, le rapport glycérophosphate/phosphate restant élevé. Nos résultats sont groupés dans le tableau III ; dans la dernière colonne à droite nous y avons joint les résultats obtenus avec une dose dix fois moindre en diastase (0 g.,02) dans le but d'observer l'influence de la concentration en diastase sur le pH optimum.

TABLEAU III.

Taka-diasatase..... 20 centigrammes
Glycérophosphate variables
Acide citrique N 50 cm³
H₂O. Q. S. p.....

t = 37°. Temps variable. Résultats en γ de P₂O₅ libérés par minute.

pH	Glycéro M/100			Glycéro M/10			Glycéro M/3,33			Glycéro M/10 deux cent de taka-diasatase		
	α	β	$\frac{v\beta}{v\alpha}$	α	β	$\frac{v\beta}{v\alpha}$	α	β	$\frac{v\beta}{v\alpha}$	α	β	$\frac{v\beta}{v\alpha}$
3,1	30,0		3,0	160,0	260,0	1,6	123,0	155,0	1,25	13,0	23,0	1,8
3,2	50,0		4,5	290,0	375,0	1,3						
3,5												
3,8	70,0		1,65	323,0	515,0	1,6	200,0	250,0	1,2	14,5	28,0	1,9
3,9												
4,0	76,0		2,15	323,0	485,0	1,5	335,0	400,0	1,2	18,3	28,5	1,55
4,1	83,0		1,72	350,0	480,0	1,37				24,0	34,0	1,4
4,2										28,0	36,5	1,3
4,3	85,0		1,56	446,0	477,5	1,15	340,0	415,0	1,2	24,0	33,0	1,37
4,5												
4,6												
4,7												
4,8												
5,1										20,0	32,5	1,6
5,2	63,0		1,9	377,0	460,0	1,22	350,0	450,0	1,28			
5,3												
5,6	30,0		1,66	216,0	325,0	1,5	258,0	366,0	1,4	17,0	31,7	1,8
5,8												
5,9												
6,1	20,0		1,5	133,0	310,0	2,33						

Nous avons en outre calculé le rapport des vitesses initiales d'hydrolyse des deux isomères $\frac{v_{\beta}}{v_{\alpha}}$, ce rapport variant avec le pH et la concentration en substrat.

Exposé des résultats.

1. Le pH optimum de la taka-diastrase varie avec la concentration en substrat ; d'une façon générale il tend à se déplacer vers la région de faible acidité lorsque la concentration en substrat augmente ; ce déplacement est beaucoup plus accentué pour l'isomère β : le pH optimum oscille de 4,0 et 3,9 pour des concentrations M/100 et M/10 en substrat à 5,2 pour une concentration M/3,33. Dans les mêmes conditions l'optimum d'hydrolyse de l' α glycérophosphate s'élève respectivement de 4,1-4,5 à 4,7 puis 5,2. Ainsi les pH optima des deux isomères, différents aux basses concentrations en substrat, sont identiques aux fortes concentrations.

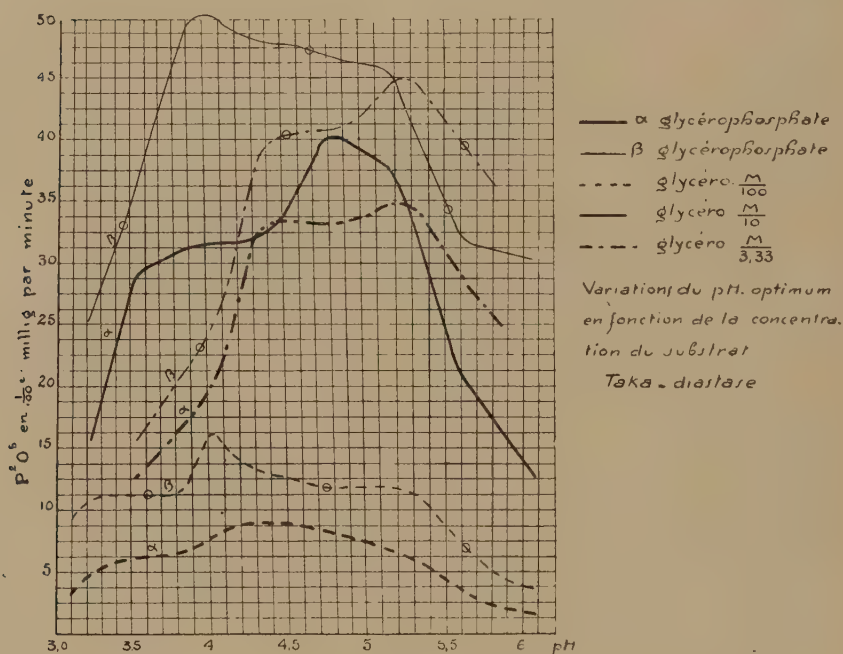
2. Le rapport des vitesses initiales $\frac{v_{\beta}}{v_{\alpha}}$ est plus élevé aux basses concentrations en substrat qu'aux fortes ; en outre, pour une même dose de glycérophosphate, sa valeur est plus grande dans la zone la plus acide ; cependant aux fortes concentrations en substrat $\left(\frac{M}{3,33}\right) \frac{v_{\beta}}{v_{\alpha}}$ ne varie pas sensiblement avec le pH.

Interprétation des résultats.

P. FLEURY [75] avait interprété les variations du pH optimum de la laccase en fonction de la concentration du gaïacol en démontrant que la courbe à optimum traduit « le conflit de deux réactions que le changement de réaction du milieu fait varier en sens inverse ».

Nous avons adopté comme hypothèse de travail la conception suivante : les deux facteurs en opposition sont l'affinité de la diastase vis-à-vis du substrat et la

vitesse maxima d'hydrolyse de ce dernier. Nous avons ainsi été amené à déterminer leurs valeurs à différents pH.



COURBE 1.

III. — DÉTERMINATION A DIFFÉRENTS pH DE L'AFFINITÉ ET DE LA VITESSE MAXIMA D'HYDROLYSE DES DEUX GLYCÉROPHOSPHATES.

Protocole expérimental.

Nous avons mesuré les variations de la vitesse initiale en fonction de la concentration du substrat à quatre pH différents.

Nos expériences ont été réalisées en opposant à 5 cg. de taka-diastase des doses variables de glycérophosphates

ajustés au pH désiré par addition d'acide citrique ; la durée d'hydrolyse à $+ 37^{\circ}$ a été fixée après des expériences préliminaires de telle façon que le pourcentage d'hydrolyse du substrat n'excède pas 10 p. 100. Aux faibles concentrations en glycérophosphate l'action tampon du substrat est minime et nous avons dû y ajouter une autre solution tampon. Le volume total du mélange réactionnel est de 25 cm³ à l'exception des expériences avec de faibles doses de substrat. Dans ces conditions pour limiter les erreurs expérimentales résultant d'une moindre précision dans le dosage de P₂O₅ libéré nous avons utilisé des proportions de réactifs multiples simples du rapport : cinq centig. de diastase — 25 cm³ de solution.

Nos résultats sont groupés dans le tableau IV ; ils nous ont permis de mesurer :

1) la vitesse initiale optima d'hydrolyse exprimée en γ de P₂O₅ libérés en une minute par la diastase réagissant sur la dose de substrat permettant l'hydrolyse optima ;

2) l'affinité K_M, inverse de la constante de MICHAELIS K_m ; pour mesurer cette dernière nous avons utilisé les deux modes de représentation graphique les plus classiques (page 33) :

a) celui de MICHAELIS et MENTEN où l'on porte en abscisses $ps = -\log [S.]$, S. étant la concentration moléculaire du substrat et en ordonnées la vitesse initiale de réaction exprimée par la quantité de γ de P₂O₅ libérés ;

b) celui d'EULER et LAURIN ; les ordonnées sont identiques mais on porte en abscisses de progression arithmétique la concentration moléculaire du substrat.

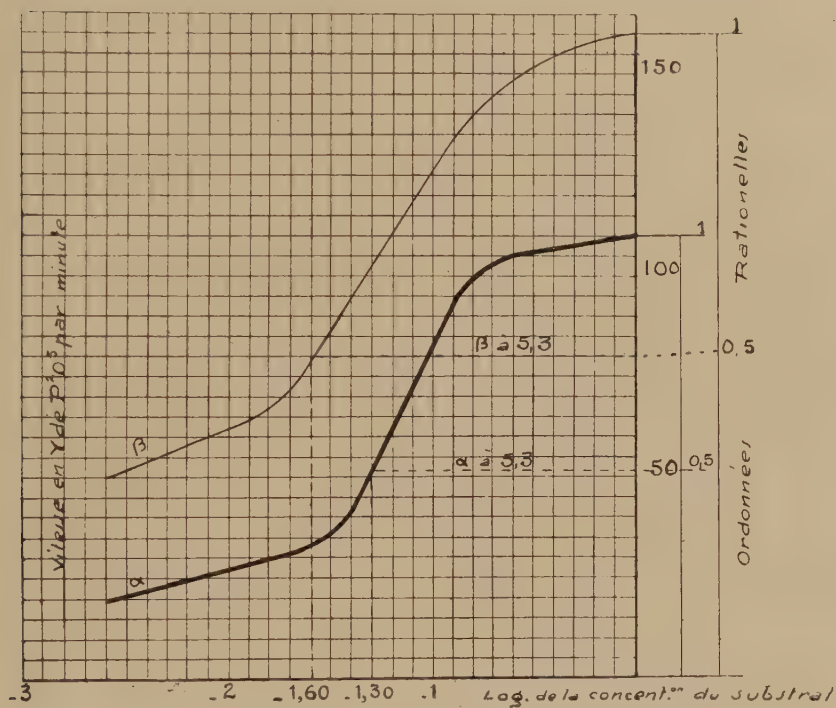
Dans certaines expériences nous avons observé une action inhibitrice du substrat à des concentrations élevées ; cette forme d'inhibition est classique et a été fréquemment signalée avec les diastases les plus diverses. On interprète en général cette inhibition par la formation de combinaisons ferment-substrat [F. S₂] ou [F. S_a]

TABLEAU IV.

Les chiffres indiquent la quantité de γ de P_2O_3 libérés par minute.

Glycérophosphate exprimé en cm ³ de glycéro- phosphate M/3	Logarithme de la concen- tration du substrat $\mu s \parallel - \log (S)$	pH 3,8		pH 4,5		pH 5,3		pH 6,4	
		α	β	α	β	α	β	α	β
0,045	3,20	15,0	33,0						
0,09	2,92	19,0	37,0						
0,1	2,81		41,0						
0,15	2,70	24,0	48,0						
0,187	2,60		50,0			20,0	50,0		
0,226	2,52			17,0	40,0				
0,375	2,30	26,0	57,0		15,0	25,0	58,0		
0,5	2,17			33,0	65,0				
0,57	2,12	31,0							
0,75	2,0	34,0	67,0	35,0	70,0				
0,9	1,92	36,0	72,0						
1,0	1,87			38,0	73,0				
1,1	1,81	37,0	75,0			30,0	66,0		
1,25	1,78			43,0	78,0				
1,3	1,76						70,0		
1,5	1,70	44,0	78,5	46,0	85,0				
1,87	1,60	50,0	82,0			35,0	80,0	12,5	19,0
2,0	1,57			50,0	89,0				
2,5	1,48			55,0	95,0				
2,66	1,45	55,0	88,0						
2,85	1,42					41,0	96,0		
3,06	1,38	66,0	92,0						
3,75	1,30	66,0	92,0	68,3	105,0	52,0	106,0	17,0	25,0
4,75	1,20					66,0			
5,0	1,17			88,0	117				
5,7	1,12					75,0		18,2	30,5
6,7	1,05								36,0
7,5	1,0	65,0	92,0			85,0	125,0	21,0	37,5
9,0	0,92					92,0	130,0	25,0	
10,1	0,87			91,0	127,0				
11,0	0,81					101,0	142,0	26,5	44,0
13,0	0,76			100,0	138,0	87,5	133,0	32,0	48,0
15,0	0,70	58,3	79,0	95,0	138,0	75,0	125,0	39,0	53,0
18,75	0,60							41,0	57,0
21,5	0,55							43,0	61,0
25,0	0,49			90,0	125,0			38,0	50,1

plus complexes et plus lentement hydrolysables que la combinaison normale [F. S.]. SCHWAB, BAMANN et LAEVERENZ [197], SOBOTKA et GLICK [200]. Quand cette inhibition se manifeste la courbe présente à sa partie supérieure un optimum très aigu (abscisses logarithmiques) ;



COURBE 2.

il est ainsi nécessaire d'interpoler graphiquement d'après l'allure générale de la courbe pour fixer la vitesse initiale maxima réelle ; les résultats sont de ce fait moins précis. Pour cette raison, lorsque nous n'avons pu obtenir le palier où la vitesse initiale maxima reste constante, nous indiquons à la fois les valeurs de l'affinité calculée par interpolation graphique dans la branche

supérieure de la courbe et la valeur maxima de l'affinité établie en considérant *a fortiori* la vitesse initiale optima comme vitesse initiale maxima. Ces divers résultats sont groupés dans le tableau V, la courbe adjointe (2) est l'une des plus caractéristiques.

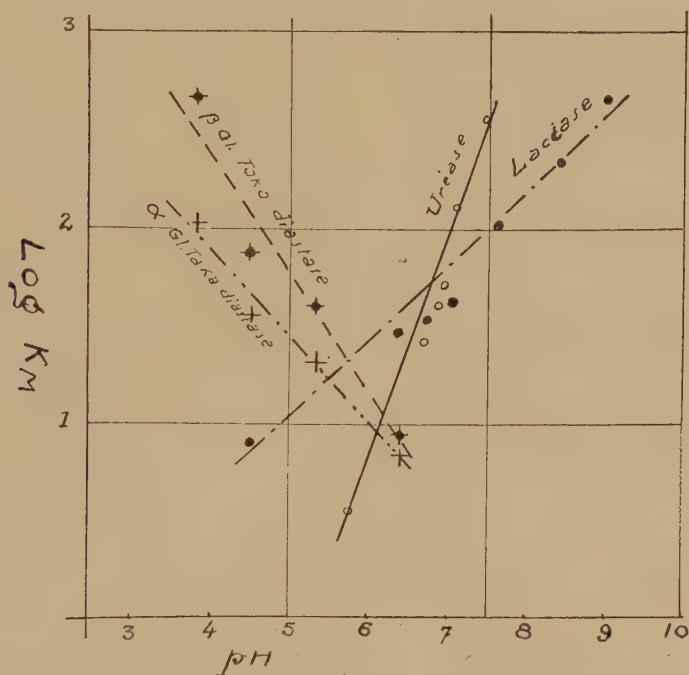
TABEAU V.

	pH 3,8	pH 4,5	pH 5,3	pH 6,4
Affinité K_M pour le β glycérophosphate :				
1° Abscisses arithmétiques	555,0	85,0	40,0	8,2
2° Abscisses logarithmiques	310,0	70,0	40,0	9,0
3° Moyenne des deux mesures	432,0	77,0	40,0	8,6
4° Valeur maxima de l'affinité	561,0	100,0	57,0	13,3
Affinité K_M pour l' α glycérophosphate :				
1° Abscisses arithmétiques	110,0	35,0	20,0	6,0
2° Abscisses logarithmiques	100,0	35,0	20,0	9,0
3° Moyenne des deux mesures	105,0	35,0	20,0	7,5
4° Valeur maxima de l'affinité	133,0	37,0	20,0	10,0
Rapport de la moyenne des affinités $\frac{K_M \beta}{K_M \alpha}$	4,1	2,2	2,0	1,15
Rapport des valeurs maxima des affinités $\frac{K_M \beta}{K_M \alpha}$	4,2	2,7	2,85	1,33
Vitesse initiale optima d'hydrolyse du β glycérophosphate en γ de P_2O_5 libérés par minute	92,0	138,0	142,0	61,0
Vitesse initiale optima d'hydrolyse de l' α glycérophosphate, en γ de P_2O_5 libérés par minute	66,0	100,0	101,0	43,0
Rapport des vitesses initiales optima $\frac{v \beta}{v \alpha}$	1,39	1,38	1,39	1,40

Interprétation des résultats.

1) L'affinité varie avec le pH, K_M croît régulièrement avec l'acidité du milieu ; dans la courbe (3) nous avons représenté les variations du logarithme de l'affinité (en

ordonnées) en fonction du pH (en abscisses) on obtient sensiblement une droite quel que soit l'isomère (α ou β -glycérophosphate). Sur le même graphique nous avons également représenté les variations du logarithme de l'affinité de la laccase vis-à-vis du gaïacol en fonction du pH et la courbe analogue établie avec l'urée et l'uréease de Soja ; ces deux courbes ont été établies d'après les valeurs que nous avons calculées page 39.



COURBE 3. — Variations du logarithme de l'affinité K_M en fonction du pH.

Avec trois diastases différentes le logarithme de l'affinité semble être une fonction linéaire du pH ; tout se passe comme s'il existait une relation :

$$(1) \quad \log K_M = (a. pH + b)$$

où a et b sont des constantes, fonctions de la diastase et

de la nature du substrat. Si nous remarquons que le pH exprime la concentration en ions hydrogène du milieu C^H d'après la relation (2) :

$$(2) \quad \text{pH} = -\log C^H$$

Nous pouvons écrire :

$$(3) \quad K_M = (C^H)^{-a} 10^b = \frac{\beta}{(C^H)^a}$$

où β et a sont deux constantes caractéristiques à la fois de chaque diastase et de chaque substrat. Il serait nécessaire de faire des expériences avec d'autres diastases dans un large intervalle de pH afin de vérifier cette relation. Remarquons en outre que l'on atteint rapidement un pH (3,0 environ avec la taka-diastase) où, bien que l'affinité vis-à-vis du substrat soit très élevée, les groupes actifs de la diastase semblent incapables de transformer le substrat ; la même observation peut être faite dans la zone alcaline avec l'uréase et la laccase ; ces faits confirment l'indépendance de l'affinité et de la vitesse maxima d'hydrolyse signalée précédemment (page 42). Pour en revenir au cas de la seule taka-diastase nous pouvons remarquer que les droites représentant les variations de $\log K_M$ des deux isomères sont inégalement inclinées sur l'axe des abscisses.

2) La vitesse optima d'hydrolyse varie différemment de l'affinité ; elle augmente tout d'abord avec l'affinité, passe par un maximum autour de pH 5,3 et diminue ensuite nettement pour une acidité plus forte. Le rapport des vitesses initiales optima $v\beta/v\alpha$ présente par ailleurs une remarquable constance et, quel que soit le pH, demeure aux environs de 1,4.

A l'aide de ces observations il nous est possible d'interpréter :

- α) les variations du pH optimum ;
- β) certaines particularités du mécanisme d'action de la diastase ;
- γ) l'action différente de la taka-diastase sur les deux glycérophosphates.

α) VARIATIONS DU pH OPTIMUM. — Nous pouvons confirmer la théorie de l'antagonisme de P. FLEURY et justifier notre hypothèse de travail. Le pH optimum résulte de l'interréaction de deux facteurs indépendants :

1) *l'affinité* qui traduit la stabilité de la combinaison diastase-substrat ;

2) *la vitesse optima* qui exprime la rapidité avec laquelle les groupes actifs de la diastase saturée de substrat transforment ce dernier. Aux basses concentrations du substrat la vitesse est proportionnelle à la concentration en combinaison diastase-substrat ou encore se trouve inversement proportionnelle à la dissociation de cette combinaison. A ces concentrations l'affinité a un rôle primordial et le pH optimum se déplace vers la zone où la concentration en combinaison diastase-substrat augmente, c'est-à-dire vers la zone de forte affinité, les variations de cette affinité sont plus grandes pour le β-glycérophosphate que pour l'α ; il en résulte que le pH optimum du β est plus fortement déplacé vers cette zone de forte affinité que celui de l'α comme nous l'avons vérifié expérimentalement.

Inversement, aux fortes concentrations du substrat, la diastase est saturée de glycérophosphate, l'affinité a un rôle effacé et c'est la vitesse propre d'hydrolyse qui influe sur l'établissement du pH optimum ; ce dernier est situé dans ces conditions vers 5,2 où nous avons observé les plus grandes vitesses optima. D'autre part, dans cette zone où l'affinité se montre pratiquement sans influence, les variations des vitesses optima des deux isomères en fonction du pH étant par ailleurs parallèles, les deux glycérophosphates devraient avoir le même pH optimum aux fortes concentrations du substrat, ce qui se trouve vérifié expérimentalement.

Par un mode de raisonnement semblable il est possible de déduire que le pH optimum doit varier avec la concentration en diastase cette variation étant inverse. L'expérience a justifié ces prévisions : en nous rappor-

tant au tableau III nous observons que pour une concentration constante en substrat ($M/10$), mais variable en taka-diastringe, le pH optimum varie également ; avec le β -glycérophosphate il croît de 3,9 pour 0 g.,20 de diastase à 4,6 avec 0 g.,02 de ferment ; cette faible dose de diastase est plus facilement saturée de substrat et la vitesse propre d'hydrolyse impose sa valeur au pH optimum.

EXTENSION DE CETTE INTERPRÉTATION A D'AUTRES DIASTASES. — Nous avons pu généraliser cette interprétation des variations du pH optimum en fonction de la concentration du substrat aux diastases dont l'affinité est sous la dépendance du pH.

a) Les phosphatases A_1 du rein et de la glande mammaire dont l'affinité augmente lorsque le pH diminue voient leur pH optimum se déplacer vers la zone acide lorsque la concentration en substrat diminue, ASAKAWA [5], JACOBSEN [111], FOLLEY et KAY [82]. Avec P. DENIS [59] nous avons montré que l'affinité de la takadiastringe pour les esters orthophosphoriques des alcools *n*-propylique et isopropylique augmente avec l'acidité ; dans ces conditions le pH optimum se déplace vers la zone de forte acidité aux faibles concentrations de ces substrats.

b) Inversement l'uréase et la laccase dont l'affinité augmente lorsque le pH s'élève (page 39) voient leur pH optimum se déplacer parallèlement vers la zone alcaline lorsque la concentration du substrat diminue. BARENDRECHT [23], LÖVGREN [147], P. FLEURY [75].

β) MÉCANISME D'ACTION DE LA DIASTASE. — Les variations du rapport des affinités de la taka-diastringe pour les glycérophosphates, opposées à la constance du rapport des vitesses optima d'hydrolyse permettent d'apporter une preuve supplémentaire à la théorie de G. BERTRAND-VILLSTÄTTER (page 45) sur la constitution dualistique des diastases.

La vitesse optima traduit la plus ou moins grande

capacité de transformation du substrat par les groupes actifs de la diastase ; cette capacité varie parallèlement en fonction du pH pour deux substrats transformables.

D'autre part, selon notre hypothèse de la page 47, l'affinité traduit la stabilité d'une combinaison d'adsorption : support colloïdal ou apo-diaïstase et substrat. Il est possible de concevoir que le pH influe non seulement sur cette adsorption et, de ce fait, sur l'affinité, mais modifie de plus le rapport des adsorptions de deux corps, en l'espèce les glycérophosphates. Les variations de l'adsorbabilité de deux corps en fonction du pH constituent un phénomène classique qui a trouvé une utilisation dans le fractionnement des diastases par emploi d'adsorbants.

γ) ACTION SIMULTANÉE SUR LES DEUX ISOMÈRES. — La taka-diaïstase présente d'une part une plus grande affinité vis-à-vis du β -glycérophosphate que vis-à-vis de l' α et, d'autre part, transforme plus rapidement cet isomère. On conçoit que cette forme soit toujours hydrolysée plus vite que l' α , ceci quelles que soient les variables : pH ou concentration du substrat.

Nous avons vérifié indirectement cette plus grande affinité de la taka-diaïstase vis-à-vis du β -glycérophosphate : dans un mélange des deux isomères la diaïstase doit en effet s'unir de préférence au β -glycérophosphate et de ce fait l'hydrolyser sélectivement. L'expérience a confirmé ces prévisions ; nous avons étudié l'hydrolyse de mélanges en proportions variables des deux glycérophosphates. Les proportions des deux isomères hydrolysés ont été évaluées par la technique d'analyse indirecte décrite page 54 où nous dosons l'acide orthophosphorique et les fonctions α -glycol libérées.

75 cm³ d'un mélange en proportions diverses de solutions M/6 d' α et de β -glycérophosphates ajustées à pH 4,4 par emploi d'acide citrique sont soumises à l'action de 15 cm³ de taka-diaïstase à 1 p. 100 ; nous avons effectué les prélèvements après 2, 4, 6 heures d'hydrolyse à 37°. Les chiffres du tableau VI indiquent les résultats

obtenus. Nous pouvons donc constater que dans un mélange de glycérophosphates la taka-diastrase hydrolyse électivement la forme β , au dessus d'un pourcentage de 60 p. 100 en cette forme elle est pratiquement seule hydrolysée ; à des concentrations égales des deux isomères il y a quatre fois plus de sel β hydrolysé que de sel α . Cette hydrolyse exclusive du β -glycérophosphate dans les mélanges renfermant plus de 60 p. 100 de ce sel tandis que l' α -glycérophosphate associé n'est pas décomposé prouve donc que la même glycérophosphatase peut s'unir avec les deux isomères.

Nous avons utilisé des concentrations relativement élevées du substrat par rapport à celles de la diastase, la vitesse diminue cependant progressivement ; comme dans les expériences analogues du tableau II l'action inhibitrice peut être rapportée aux phosphates libérés. Il ne s'agit pas d'une destruction partielle de la diastase : le ferment est inactivé par chauffage de cinq minutes à 100° après 2 ou 4 heures d'hydrolyse, si nous ajoutons alors une quantité égale de taka-diastrase active, l'hydrolyse, pendant l'intervalle consécutif de deux heures, est à peu près identique à celle observée au cours du même intervalle avec la taka-diastrase réagissant depuis le début de la réaction normale ; la marche de la réaction reprend donc à l'allure qu'elle présentait au moment de l'inactivation par la chaleur.

IV. — INFLUENCE DE DOSES VARIABLES DE DIASTASE SUR UNE DOSE CONSTANTE DE SUBSTRAT.

Nous avons signalé (page 42) que le pouvoir fixateur d'une diastase semble être un test quantitatif indépendant de l'affinité ; un élément d'incertitude demeurerait du fait que les mesures de l'affinité et du pouvoir fixateur avaient été effectuées par des enzymologistes différents et de ce fait avec des échantillons diastasiques distincts. Dans le but de préciser et confirmer ces expé-

riences disparates nous avons mesuré le pouvoir fixateur de la taka-diastase vis-à-vis des α et β -glycérophosphates.

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL. — A 20 cm³ de glycérophosphate M/6 ajusté à pH 4,5 par addition d'acide citrique nous avons opposé des doses croissantes de taka-diastase (le volume total de la réaction demeurant de 50 cm³). Nous avons vérifié que l'addition de fortes doses de diastase ne déplaçait pas le pH du milieu ; l'effet tampon de la taka-diastase presque exclusivement composée de glucides est infime. Nos résultats sont exposés dans le tableau VII.

DICUSSION DES RÉSULTATS. — La constante des réactions monomoléculaires K croît tout d'abord avec la concentration en diastase mais il n'y a pas de relation linéaire entre K et la dose de diastase ; cette relation linéaire n'a d'ailleurs été observée avec d'autres diastases que dans un intervalle relativement étroit et en maintenant constante la concentration en préparation fermentaire totale (diastase active + diastase inactivée totalement par ébullition = constante). Nous tenions à respecter le protocole opératoire de COLIN et Mlle CHAUDUN, c'est-à-dire fixer un seuil de réaction ; pour cette raison nous n'avons pas ajouté de diastase inactivée. A partir d'une certaine dose de taka-diastase (0 g.,79) la vitesse de réaction demeure à la fois maxima et constante lorsque la concentration en diastase continue à croître. Cette zone de constance apparaît avec une dose égale de diastase pour des quantités équimoléculaires des deux isomères ce qui tend à prouver :

- 1) que les deux glycérophosphates sont hydrolysés par une seule et même phosphatase.
- 2) qu'une diastase présentant des affinités différentes pour deux substrats peut avoir un même pouvoir fixateur vis-à-vis de quantités équimoléculaires de ces deux corps.

TABLEAU VII.

Glycérophosphate M/6 pH 4,5..... 20 cm³

Eau + taka-diastase Q. S. p..... 50 cm³

P₂O₅ en mg. libérés $K = \frac{1}{t} \log \left(\frac{a}{a-x} \right)$ t en secondes. log. décimaux.

Taka- diasta- se (en g.)	Temps (en m.)	P ₂ O ₅ libéré en mg.		K × 10 ⁷		Valeur moy. de K × 10 ⁷		$\frac{K \beta}{K \alpha}$
		α	β	α	β	α	β	
0,05	90	7,0	10,6	26	37	25,5	37	1,5
	180	14,5	21	25	37			
0,125	90	14,5	18,5	52	65	50	70	1,4
	180	26,5	39,5	48	74			
0,25	90	17	25	59	90	58,5	95,0	1,6
	180	32	52	58	100			
0,50	90		45,5		170	85	180	2,1
	180	45,5	89,0	85	190			
0,75	45	27,0	59,0	195	460	196	450	2,29
	90	51,5	99,0	196	440			
0,79	20	21,0		333		333	619	1,85
	40	40,0	69,0	333	619			
0,83	20	23,0	36,0	366	608	349	595	1,7
	40	40,0	66,0	333	583			
0,875	20	22,0	32,0	350	533	342	558	1,63
	40	40,0	66,0	333	583			
1,0	20	23,0	36,0	366	608	349	613	1,75
	40	40,0	69,0	333	619			
1,80	20	23,0	36,0	366	608	335	613	1,83
	40	36,0	69,0	304	619			

Le pouvoir fixateur d'une diastase est donc un test quantitatif indépendant de l'affinité K_m . Au cours de ces réactions l'affinité intervient cependant pour fixer le rapport des vitesses d'hydrolyse des deux isomères. En effet si nous reprenons l'équation (3) du chapitre II (page 33)

$$v = C \psi \frac{[S.]}{[S.] + K_m}$$

nous pouvons calculer le rapport des vitesses initiales d'hydrolyse des deux glycérophosphates v_β/v_α ; nous avons vu que la vitesse initiale maxima est égale à $C \psi$ où C est un facteur de proportionnalité variable avec la nature chimique du substrat et ψ , la concentration totale en diastase. Soit C_β ce facteur de proportionnalité pour le β glycérophosphate et C_α pour l' α , nous pouvons remplacer respectivement $C_\beta \psi$ et $C_\alpha \psi$ par $v.$ maxima β et $v.$ maxima α , $K_m \beta$ et $K_m \alpha$ représentant les constantes de MICHAELIS des deux isomères ; nous obtenons finalement

$$\frac{v \beta}{v \alpha} = \frac{v. \max. \beta}{v. \max. \alpha} \frac{[S.] + K_m \alpha}{[S] + K_m \beta}$$

Nous pouvons calculer la valeur de ce rapport en connaissant $[S]$, les autres termes ont été mesurés à pH 4,5 (tableau IV) ; nous trouvons pour le rapport v_β/v_α une valeur voisine de 1,85. Au cours de nos expériences permettant de mesurer le pouvoir fixateur (tableau VII) le rapport des constantes monomoléculaires K_β/K_α correspond à celui des vitesses initiales ; avec 10 valeurs différentes de ψ nous obtenons pour le rapport K_β/K_α une valeur moyenne de 1,75, ce qui correspond sensiblement à la valeur calculée. Nous pouvons donc vérifier que l'affinité intervient pour fixer les vitesses respectives de réaction sans modifier le seuil à partir duquel cette vitesse devient constante. Il semble très difficile d'interpréter la nature de ce seuil, peut-être faut-il faire intervenir la théorie de la double affinité et admettre qu'il existe une dissociation de la combinaison co-diaстase-

liaison ester phosphorique, dissociation qui est indépendante de la nature du radical carboné situé au voisinage de cette liaison ester. Quelle que soit l'interprétation de la nature de ce seuil il n'en reste pas moins que la mesure du pouvoir fixateur de COLIN et CHAUDUN. fournit un test quantitatif d'une diastase et permet de différencier des enzymes différents coexistant dans la même préparation.

V. — ACTION DE DIVERS COMPOSÉS CHIMIQUES
SUR L'HYDROLYSE DES GLYCÉROPHOSPHATES PAR LA TAKA-
DIASTASE.

Dans le but de confirmer nos conclusions antérieures, à savoir qu'une seule et même phosphatase hydrolyse les deux glycérophosphates, nous avons étudié l'influence de divers composés chimiques sur l'hydrolyse des deux isomères. Nous avons réalisé cette étude de trois façons différentes en faisant varier isolément et successivement l'un des facteurs : composé chimique, concentration en substrats et dose de la diastase.

A) ACTION DE DOSES VARIABLES DE DIFFÉRENTS CORPS SUR DES DOSES CONSTANTES DE TAKA-DIASTASE ET GLYCÉROPHOSPHATES. — Nous avons étudié l'influence des corps suivants :

1) Un activateur de certaines phosphatases : le magnésium ; avec ce corps exclusivement nous avons réalisé une série d'expériences avec des concentrations en substrat différentes (tableau IX).

2) Des inhibiteurs de diverses phosphatases : fluorure et arséniate de sodium.

3) Des diastases réagissant différemment de la taka-diastase vis-à-vis des α et β glycérophosphates ; nous avons recherché si ces diastases, inactivées par ébullition, renfermaient des substances thermostables orientant l'activité de la diastase vis-à-vis des glycérophosphates. Nous avons eu recours aux phosphatases de Moutarde blanche et Amande douce.

TABLEAU IX.

Taka-diastrase..... 0 g,05
 Glycérophosphate M/6..... variable
 Acide citrique q. s. pH 4,5
 (NO₃)²Mg, M/x..... variable
 Eau distillée, q. s. 50 cm³
 3 heures à 37°. pH 4,5.

Les chiffres indiquent le nombre de millig. de P₂O₅ libérés en 3 heures.

Glycérophosphate M/3 (en cm ³)	Témoin (1)		Concentration moléculaire de Mg ajouté							
			2.10 ⁻⁴		2.10 ⁻³		2.10 ⁻²		2.10 ⁻¹	
	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β
0,5	2,5	6,5	2,5	7,0	2,5	6,5	2,5	7,0	0	0
1,0	4,5	9,0	5,0	10,0	4,5	11,0	5,0	10,5	0	0
2,0	7,0	13,5	8,0	14,5	7,0	14,0	7,5	14,5	0	0
2,5	8,0	14	8,0	15,0	8,5	15,0			0	0
5,0	9,5	17,5			11,5	16,5	14,0	17,0	2,5	5,0
10,0	10,0	17,5	13,5	20,5	13,0	20,5	13,0	20,0	2,75	5,25
25,0	14,5	18,0	14,0	20,75	14,0	21,5	14,0	22,0	2,0	5,0

(1) La taka-diastrase contient 1,40 p. 1000 de Mg et 0,75 p. 1000 de Ca ce qui correspond à une concentration 58.10⁻⁵ M en Mg dans le témoin.

4) Deux alcaloïdes optiquement actifs modifiant la spécificité des lipases : quinine et strychnine.

5) Enfin nous avons utilisé de fortes doses d'alcool éthylique et glycérol et un antiseptique l'o-oxyquinoléine.

En présence d'alcaloïdes et d'acide arsénique nous avons utilisé les techniques analytiques modifiées décrites précédemment (page 53).

Interprétation des résultats. — Les résultats des expériences décrites dans les tableaux VIII et IX permettent de faire les observations suivantes :

1) D'une façon générale les différentes substances chimiques réagissent d'une façon semblable sur l'hydrolyse des deux glycérophosphates, ce qui tend à indiquer soit des sensibilités égales des α et β glycérophosphatases éventuelles soit, ce qui est plus logique, l'existence d'une seule glycérophosphatase.

2) Les divers composés chimiques ont des actions nettement différentes :

a) Les sels de magnésium n'exercent pas la très nette action stimulante observée avec les phosphatases A_1 ; nous avons cependant noté, avec des concentrations moyennes en magnésium, une légère action activante qui semble croître avec la concentration du substrat, comme si le magnésium protégeait la diastase contre l'action inhibitrice soit de fortes doses du substrat soit des orthophosphates libérés.

A une concentration 0,2 M le magnésium est un inhibiteur énergique et à une concentration 0,4 M il fait disparaître toute activité diastasique. Dans les conditions où les sels de magnésium accélèrent légèrement l'activité de la taka-diastase, une concentration très faible de magnésium $2 \cdot 10^{-4}$ M suffit pour activer totalement la diastase ; il est à remarquer que la taka-diastase contient des quantités non négligeables de magnésium ($58 \cdot 10^{-5}$ M dans l'expérience témoin).

b) Les phosphatases d'Amande et Moutarde ne con-

tiennent ni inhibiteur, ni activateur thermostable de la phosphatase de la taka-diastrase.

c) Le fluorure de sodium est un inhibiteur très énergique comme l'avaient observé plusieurs auteurs (page 19).

d) L'o-oxyquinoléine, antiseptique énergique, est un inhibiteur relativement faible ; son action inhibitrice plus faible que celle de la strychnine est sensiblement égale à celle de la quinine.

e) A fortes doses l'alcool éthylique et le glycérol sont inhibiteurs ; leur action inhibitrice ne peut être rapportée à une synthèse d'esters phosphoriques qui ne se produit pas à ces concentrations comme nous l'avons vérifié.

f) Enfin l'action des divers inhibiteurs est proportionnelle à leurs concentrations.

B) MESURE DE L'AFFINITÉ DE LA TAKA-DIASTASE EN PRÉSENCE DE DIVERS COMPOSÉS CHIMIQUES. — Nous avons cherché à savoir si certains de ces composés agissaient d'une façon semblable sur l'hydrolyse des α et β glycérophosphates. Nous avons donc mesuré leur influence sur l'affinité et la vitesse maxima d'hydrolyse des deux isomères.

Dans ce but nous avons opposé à 37°, dans un volume total de 50 cm³, 0 g.,05 de taka-diastrase et une dose constante d'inhibiteur à des quantités variables de substrats ajustés à pH 4,5 par addition d'acide citrique.

L'affinité a été calculée d'après les déterminations expérimentales selon les méthodes décrites au chapitre III (page 62). En présence des substances étudiées nous indiquons dans le tableau X la vitesse initiale exprimée en γ de P₂O₅ libérés par minute et la vitesse relative rapport de la vitesse initiale en présence du composé chimique à la vitesse initiale du témoin fixée arbitrairement à 100, ceci pour des concentrations en substrat égales. Les variations de la vitesse relative en fonction de la concentration du substrat permettent en effet de se rendre compte si l'inhibiteur est *absolu* : vitesse relative indépendante de la concentration du substrat, ou

[illegible]

concurrent : vitesse relative croissant avec la concentration du substrat.

Nos résultats expérimentaux constituent la matière du tableau X ; les valeurs calculées à l'aide de ces résultats sont rassemblées dans le tableau XI.

Nous pouvons observer en premier lieu que chacun des divers corps étudiés agit d'une façon semblable et parallèle sur l'affinité et la vitesse maxima d'hydrolyse des α et β glycérophosphates. Tout se passe donc comme s'il n'existait qu'une seule glycérophosphatase.

Les divers corps réagissent par contre d'une façon variable sur les deux facteurs affinité et vitesse maxima. Nous allons passer successivement en revue les résultats obtenus.

1) L'affinité du *témoin* vis-à-vis des deux glycérophosphates est sensiblement la même que celle précédemment mesurée au paragraphe III 77,5 avec le β -glycérophosphate contre 77 précédemment et 35 contre 43,5 avec l' α . Dans les mesures du paragraphe 3 nous avons utilisé une concentration de 2 p. 1000 en taka-diastrase ; ces nouvelles expériences ont été réalisées avec une concentration de 1 p. 1000 en diastase. Nous pouvons donc vérifier avec la phosphatase de la taka-diastrase que l'affinité est indépendante de la concentration en diastase (page 37).

2) Le *glycérol* se comporte à la fois comme un inhibiteur concurrent et comme un inhibiteur absolu ; il diminue apparemment l'affinité et réduit considérablement la vitesse maxima d'hydrolyse. L'inhibition absolue l'emporte nettement sur l'inhibition concurrente car la vitesse relative ne croît que très faiblement avec la concentration en substrat.

3) L'*alcool éthylique* n'est pas un inhibiteur concurrent, il augmente même légèrement l'affinité, peut-être en modifiant l'hydratation et partant, la capacité d'adsorption du support colloïdal ; le fait est particulièrement net avec le β glycérophosphate. Il en résulte le phé-

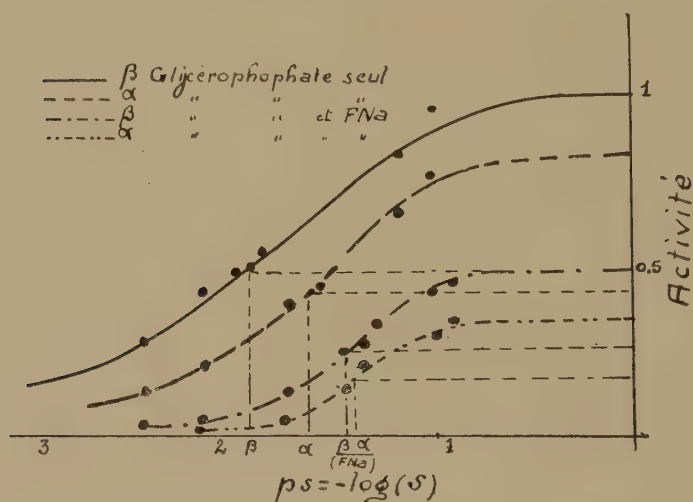
TABLEAU XI.
Valeurs calculées d'après les données expérimentales du tableau précédent.

Inhibiteur		témoin	glycérol	éthanol	phosphate	arséniate	fluorure	strychnine	émulsine	(1) magnésium
Affinité K_M pour l' α glycér- rophosphate	abscisses logarithmiques	44	20	50	16	20	25	22	40	40
	abscisses arithmétiques	43	21	50	16,6	21	25	24	46	50
	valeur moyenne	43,5	20,5	50	16,3	20,5	25	23	43	45
Affinité K_M pour le β glycér- rophosphate	abscisses logarithmiques	80	31	200	20	22	28	32	86	90
	abscisses arithmétiques	75	40	200	16,6	21	25	35	86	92
	valeur moyenne	77,5	36	200	18,5	21,5	26,5	33,5	86	91
$\frac{K_M \beta}{K_M \alpha}$		1,78	1,75	4	1,43	1,05	1,06	1,45	2	2
vitesse optima d'hydrolyse de l' α glycérophosphate (en γ de P_2O_5 libérés par minute)		100	22,8	46	55	29	41,6	75	85	15,3
vitesse optima d'hydrolyse du β glycérophosphate (en γ de P_2O_5 libérés par minute)		129	27	66,5	71	57	60	108	104	29
$\frac{v. \text{ opt. } \beta}{v. \text{ opt. } \alpha}$		1,29	1,04	1,45	1,3	1,96	1,44	1,44	1,22	1,9

(1) D'après les expériences du tableau VII à la concentration 0,2 M en Mg

nomène apparemment paradoxal suivant : la vitesse relative diminue lorsque la concentration en substrat augmente. L'alcool se comportant par ailleurs comme un inhibiteur concurrent, nous pouvons séparer à nouveau les deux notions d'affinité et de vitesse maxima puisqu'un inhibiteur peut augmenter l'affinité, l'interaction des deux facteurs affinité-vitesse maxima se traduisant finalement par une inhibition qui croît avec la concentration du substrat. Il faut d'ailleurs remarquer que la forte concentration en alcool augmente la concentration en glycérophosphate dans la fraction aqueuse et *a priori* l'action inhibitrice du substrat.

4) Les phosphates sont à la fois inhibiteurs concurrents et absolus. Ils diminuent apparemment l'affinité et leur action inhibitrice est inversement proportionnelle à la concentration du substrat.



COURBE 4. — Hydrolyse de doses variables des α et β glycérophosphates par la taka-diastase en présence et en l'absence de fluorures. S = concentration moléculaire en substrat.

5) Les arsénates se comportent de la même façon que les phosphates, ce qui tendrait à montrer que le support

colloïdal de la diastase présente une certaine affinité chimique pour des corps voisins : phosphates et arsénates.

6) Le mode d'action du *fluorure* se rapproche de celui des phosphates et arsénates ; c'est un inhibiteur à la fois concurrent et absolu ; l'inhibition concurrente est particulièrement nette comme le montre la courbe ci-jointe, l'affinité est apparemment augmentée et la vitesse relative croît régulièrement avec la concentration du substrat.

7) La *strychnine* se comporte également comme un inhibiteur concurrent. Il apparaît *a priori* assez difficile de conclure à une affinité chimique spécifique de la diastase pour l'inhibiteur puisqu'en dehors des phosphates et arsénates qui possèdent une certaine parenté chimique, le glycérol, les fluorures et la strychnine exercent également une inhibition du même type.

8) A côté de ces composés qui modifient l'affinité l'*émulsine inactivée* par chauffage et le *nitrate de magnésium* à de fortes concentrations se comportent comme des inhibiteurs absolus ; la vitesse relative est sensiblement indépendante de la concentration du substrat.

C) INFLUENCE DES ARSÉNATES ET DES FLUORURES SUR LE POUVOIR FIXATEUR DE LA TAKA-DIASTASE. — Nous avons cherché à confirmer l'indépendance de l'affinité et du pouvoir fixateur en étudiant l'influence de deux inhibiteurs concurrents : les fluorures et les arsénates sur le pouvoir fixateur de la taka-diastrase. Nous avons utilisé la même préparation fermentaire et le même protocole opératoire que pour l'expérience du chapitre IV (page 73). Les résultats expérimentaux sont classés dans les tableaux XII et XIII qui nous ont permis de tracer les courbes ci-jointes ; nous pouvons en dégager les conclusions suivantes :

1) La dose de taka-diastrase au-dessus de laquelle la vitesse de réaction demeure à la fois maxima et constante se trouve entre 0 g.,80 et 0 g.,90, ceci quel que

TABLEAU XII.

Pouvoir fixateur de la taka-diastase en présence d'arsénates.

Solution $\frac{M}{6}$ de glycérophosphate..... 20 cm³

Solution $\frac{M}{4}$ d'arsénate disodique 4 cm³

Taka-diastase x

Acide citrique N q. s. pour ajuster à pH 4,5.

Eau bidistillée q. s. 50 cm³

Température = 37° pH 4,5

Taka-diastase (en g)	Temps (min.)	P ₂ O ₅ (en mg.)		(1) K × 10 ₇		Valeur moyenne de K. × 10 ₇		$\frac{K\beta}{K\alpha}$	(2) K'/K	
		α	β	α	β	α	β		α	β
0,05	180	5	12	8,3	22	8,3	21	2,5	3,0	1,8
	360	10	23	8,3	20					
0,25	90	13	22	44	77	40	74	1,8	1,5	1,3
	180	20	38	35	70					
0,50	80	16	39	63	163	60,5	154	2,54	1,4	1,17
	160	29	64	58	146					
0,80	80	24	56	92	245	100	245	2,45	3,3	2,58
	160	51		109						
0,86	20	7	14	108	220	106	226	2,13	3,2	2,5
	40	13	29	104	233					
0,925	20	8	18	125	283	125	289	2,3		
	40	16	36	125	295					
1,0	80	31	74	122	341	106	294	2,7	3,3	2,1
	160	45	100	91	247					
1,10	20	9	16	140	266	140	264	1,8		
	40	18	32	140	262					
1,25	20	9	16	140	266	140	280	2,0		
	40	18	35	140	295					
1,50	20	8	16	125	266	129	260	2,0		
	40	17	31	133	254					

(1) $K = \frac{1}{t} \log \left[\frac{a}{a-x} \right] t$ en secondes-logarithmes vulgaires, x quantité du substrat de concentration initiale a hydrolysé au bout du temps t.

(1) K' constante des réactions monomoléculaires du témoin.

TABLEAU XIII.

Pouvoir fixateur de la taka-diastase en présence de fluorures.

Solution $\frac{M}{6}$ de glycérphosphate à pH 4,5..... 20 cm³
 Fluorure de sodium N/10 2 cm³
 Taka-diastase x g.
 Eau bidistillée, q. s. 50 cm³
 Température 37° pH 4,5

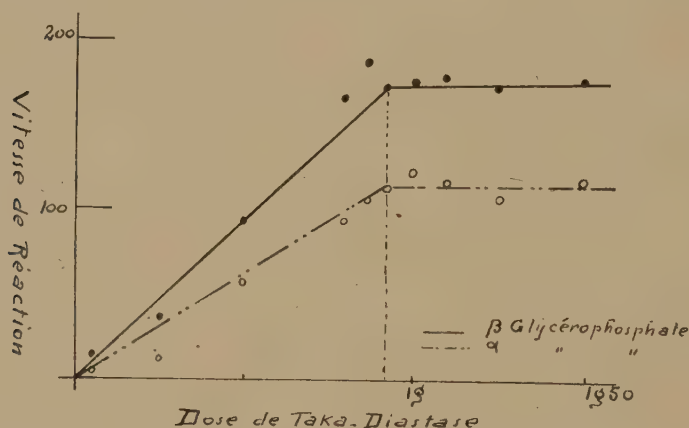
Taka-diastase (en g.)	Temps (min.)	P ₂ O ₅ libéré (en mg.)		(1) K × 10 ₇		moyenne K × 10 ₇		$\frac{K\beta}{K\alpha}$	(2) $\frac{K'}{K}$	
		α	β	α	β	α	β		α	β
0,05	90	1,3	5,0	4,4	16	3,6	13,5	3,7	7,0	2,7
	180	1,6	6,6	2,7	11					
0,25	90	3,0	11,0	10	37	10,5	37,0	3,5	4,4	2,0
	180	6,5	21,5	11	37					
0,50	20	3,5	6,0	56	91	57	91	1,6	1,5	2,0
	40	7,5	12,0	58	91					
0,80	20	6,0	11,0	91	158	91	162	1,78	3,65	3,5
	40	12,0	21,0	91	166					
0,86	20	7,0	12,0	108	183	104	187	1,8	3,3	3,0
	40	13,0	24,0	100	191					
0,925	20	7,5	11,0	116	166	112	170	1,53		
	40	14,0	22,0	108	174					
1,0	20	8,5	11,0	133	166	120	172	1,43	2,9	3,55
	40	14,0	22,5	108	178					
1,10	20	7,5	11,0	116	166	116	174,5	1,5		
	40	15,0	23,0	116	183					
1,25	20	7,0	11,5	108	166	104	170	1,63		
	40	13,0	22,0	100	174					
1,50	20	7,0	10,5	108	166	112	172	1,53		
	40	15,0	22,5	116	178					

(1) et (2) Comme tableau XII.

soit l'inhibiteur (fluorure ou arséniate) et quel que soit le substrat (α ou β glycérophosphate). Dans l'expérience antérieure sans inhibiteur nous avons obtenu le palier à partir de 0 g.,79 à 0 g.,83 de diastase.

Ainsi les fluorures et arséniate qui modifient apparemment l'affinité ne modifient pas sensiblement le pouvoir fixateur.

2) En présence de l'un ou de l'autre inhibiteur le pouvoir fixateur reste le même vis-à-vis des deux glycérophosphates ce qui confirme que la même diastase hydrolyse les deux formes.



COURBE 5. — Pouvoir fixateur de la taka-diastase vis-à-vis des α et β glycérophosphates en présence de fluorure.

VI. — ACTION DU VIEILLISSEMENT SUR L'ACTIVITÉ D'UNE PRÉPARATION DE TAKA-DIASTASE.

Les propriétés d'une préparation diastasique peuvent se modifier au cours de sa conservation. C'est ainsi que le pH optimum de la β -glucosidase d'Amande vis-à-vis du salicoside est déplacé quatre ans après sa préparation, BERTRAND et COMPTON [32]. D'autre part dans une préparation contenant des diastases différentes la conservation en inactive certaines sélectivement. Dans un

TABLEAU XIV.

Taka-diafase..... 0 g,05
 Glycérophosphate $\frac{M}{3}$ pH 4,5..... x cm³
 Tampon acide citrique-soude pH 4,5 10 cm³
 Eau distillée, q. s..... 50 cm³

t = + 37°

cm ³ de substrat $\frac{M}{3}$										
	4,25	2,5	3,75	5,0	7,5	10	12,5	15	17,5	20
	8,3	29,4	50,0	62,5	75,0	95	91	108	83	83
α glycérophosphate										
β glycérophosphate	66	83	144	146	—	144	133	150	108	108

γ de P₂O₅ libérés
par minute

échantillon d'émulsine d'Amande préparé huit ans auparavant, BRIDEL et Mlle DESMARET [37] ont trouvé que l'activité hydrolysante et synthétisante de la β glucosidase n'était pratiquement pas modifiée ; par contre celle de la β galactosidase avait légèrement diminué et celle de la sucrase était fortement réduite. Une émulsine conservée depuis 23 ans renferme encore une β glucosidase et une β galactosidase dont l'activité est sensiblement moitié de celle d'une préparation fraîche ; la sucrase, par contre, est totalement inactivée, BRIDEL et Mlle DESMARET [38].

Nous avons pu étudier un échantillon de taka-diastrase (koji-ferment) MERCK conservé depuis 38 ans en flacon plein, bouché liège et recouvert de cire (1). Cette taka-diastrase contenait une phosphatase active sur les α et β glycérophosphates ; nous avons déterminé son action sur des doses croissantes de ces substrats (Tableau XIV). Ces expériences nous permettent de fixer vers 80,0 l'affinité K_M vis-à-vis du β glycérophosphate et vers 40,0 pour l' α . Dans nos conditions expérimentales la vitesse optima d'hydrolyse est de 150 γ de P_2O_5 libérés par minute avec le β glycérophosphate contre 108 γ avec l' α . Cet échantillon âgé est donc au moins aussi actif que les préparations fraîches utilisées au cours de ce travail, son activité serait même légèrement supérieure si l'on tient compte du fait que le vieil échantillon MERCK contient une forte proportion de phosphore minéral inhibiteur (20 cent. de P_2O_5 par g.), tandis que les échantillons de taka-diastrase de PARKES et DAVIES ne renferment que 1 à 3 cg. de P_2O_5 par g. Nous pouvons donc en conclure qu'un échantillon de taka-diastrase conservé avec précaution pendant trente-sept ans renferme une phosphatase très active dont l'affinité vis-à-vis des α et β glycérophosphates est du même ordre de grandeur que celles

(1) Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à notre ami M. JANOT, Maître de Conférences, qui nous a procuré cette diastase conservée dans une armoire au laboratoire de Pharmacie Galénique de la Faculté de Pharmacie de Paris ; nous remercions également la Firme MERCK qui nous a indiqué la date de la livraison de l'échantillon (mars 1899).

de préparations fraîches ; les caractères généraux sont identiques : affinité plus élevée vis-à-vis du β glycérophosphate que de l' α , vitesse optima d'hydrolyse plus grande pour le β que pour l' α .

D'autres diastases de la taka-diastrase conservaient d'ailleurs leur activité ; nous avons pu caractériser dans le vieil échantillon MERCK les enzymes suivants : pyrophosphatase (pyrophosphate de soude), sucrase (saccharose), β glucosidase (salicoside), α glucosidase (maltose), amylase (amidon de Blé) ; par contre nous n'avons pu déceler d'action hydrolysante sur le lactose.

Conclusions générales de la deuxième partie.

Les recherches qui viennent d'être exposées permettent de conclure que les α et β glycérophosphates sont hydrolysés par la même glycérophosphatase de la taka-diastrase. Voici, brièvement résumés, les principaux arguments qui dérivent de nos observations :

a) Dans un mélange des deux glycérophosphates, l'hydrolyse de ces deux sels est proportionnelle à la fois aux concentrations respectives des deux corps dans le mélange et aux affinités de la diastase vis-à-vis des deux isomères. L'affinité étant plus élevée vis-à-vis du β que de l' α , dans un mélange où le pourcentage en forme β est égal ou supérieur à 60 p. 100 le β glycérophosphate est pratiquement seul hydrolysé ; cette hydrolyse est aussi rapide que celle d'une solution ne contenant que cette forme, l' α glycérophosphate n'est pas modifié dans ces conditions.

b) Le pouvoir fixateur de la taka-diastrase est égal vis-à-vis des deux isomères aussi bien en solutions pures qu'en présence d'inhibiteurs (arséniates ou fluorures).

c) Les inhibiteurs influent d'une façon similaire sur le mécanisme d'hydrolyse des deux glycérophosphates, ceci quelles que soient les proportions relatives d'inhibiteur et de substrat.

d) Le vieillissement ne modifie pas la spécificité d'action vis-à-vis des glycérophosphates.

La phosphatase A_3 de la taka-diastringe possède une plus forte affinité vis-à-vis du β glycérophosphate que de l' α . Lorsque cette diastase est saturée de substrat ses groupes actifs hydrolysent le β glycérophosphate plus rapidement que l' α . D'autre part, tandis que les affinités vis-à-vis des deux isomères augmentent avec l'acidité du milieu, les vitesses maxima varient différemment. L'interréaction des deux facteurs : affinité et vitesse maxima permet d'interpréter d'une part l'hydrolyse plus rapide du β glycérophosphate dans toutes conditions, d'autre part les variations du pH optimum en fonction de la concentration du substrat.

Nous avons d'autre part précisé certains caractères de la phosphatase A_3 de la taka-diastringe : cette phosphatase est très faiblement activée par le magnésium, insensible à l'action de faibles doses de glycérol ; les arsénates, les phosphates, les fluorures et le nitrate de strychnine sont des inhibiteurs concurrents de cette diastase.

TROISIÈME PARTIE.

Etude des phosphatases de graines.

Dans un mémoire antérieur [54] nous avons signalé que les graines contenaient des phosphatases du type A_2 , les graines oléagineuses étant plus actives que les amylacées. Certaines de ces diastases dédoublent le β glycérophosphate plus rapidement que l' α ; les autres dédoublent ces deux corps à des vitesses sensiblement identiques.

Nous étudierons séparément ces deux groupes de phosphatases en faisant porter plus spécialement nos recherches sur une diastase caractéristique de chaque groupe : Moutarde blanche et Amande douce. Nous relaterons dans le troisième chapitre nos essais poursuivis en vue d'obtenir des préparations purifiées de phosphatase d'Amande.

CHAPITRE I.

ETUDE DES PHOSPHATASES DE GRAINES DÉDOUBLANT LE β GLYCÉROPHOSPHATE PLUS RAPIDEMENT QUE L' α

Afin de pouvoir effectuer une comparaison avec la taka-diastrase nos expériences présentent de nombreuses analogies avec celles réalisées avec ce ferment ; c'est ainsi que nous avons étudié l'influence de divers facteurs sur le dédoublement des deux isomères : durée d'hydrolyse, température de la réaction, concentration du substrat, action de divers composés chimiques, en particulier du glycérol et des phosphates.

A) INFLUENCE DE LA DURÉE D'HYDROLYSE A DIVERSES TEMPÉRATURES.

Nous avons employé les préparations fermentaires obtenues en précipitant par l'alcool les liqueurs obtenues par macération des poudres de graines. Les expériences ont été réalisées : à la température ordinaire ($+ 15^{\circ}$ à $+ 20^{\circ}$), à $+ 37^{\circ}$, et à $+ 54^{\circ}$ ceci avec les phosphatases de Moutarde blanche et Pavot ; avec la Moutarde noire nous n'avons fait qu'une seule expérience à $+ 37^{\circ}$. Comme substrats nous avons employé des solutions pures des deux glycérophosphates et un mélange équimoléculaire des deux formes.

A 20 cm³ du substrat M/4 acidifié à pH 5,7 par l'acide citrique nous avons ajouté 80 cm³ d'eau et la poudre fermentaire ; la vitesse de réaction a été estimée en dosant l'acide phosphorique et le glycérol : A des pourcentages d'hydrolyse élevés (> 90 p. 100) nous avons dosé le phosphore organique résiduel (après élimination

du phosphore minéral et destruction de la matière organique).

Ces diverses expériences ont fourni des résultats analogues ; nous ne relatons que les plus typiques dans les Tableaux XV, XVI et XVII ; dans le Tableau XVIII nous étudions l'influence du glycérol et des phosphates sur la phosphatase de la Moutarde blanche et dans le Tableau XIX l'action de doses constantes de phosphates sur des doses variables de cette diastase.

L'examen de ces divers tableaux permet d'observer les faits suivants :

1) Avec des températures et durées de réaction variables les trois phosphatases hydrolysent toujours le β glycérophosphate plus rapidement que l' α .

TABLEAU XV.

Hydrolyse par la Moutarde blanche à $+ 20^{\circ}$

Temps (en jours)	cm ³ de periodate M/20 nécessaires pour oxyder les fonctions α -glycol libérées dans 2 cm ³			Pourcentage d'hydrolyse						constante monomoléculaire K. 10 ³	
				en dosant le glycérol libéré		en dosant P ₂ O ₅ libéré					
	α	α β } aa	β	α	β	α	α β } aa	β	α	β	
2	0,25	0,4	0,55	12,5	13,7	11,2	12,6	12,6	31,5	37	
4	0,4	0,65	0,9	20	22,5	19,8	21,5	22,5	27,7	32	
6	0,55	0,9	1,2	27,5	30	26,6	28,1	29,5	26,3	29,8	
11	0,8	1,3	1,8	40	45	38,7	40,5	42,2	23	25,8	
30	1,2	1,9	2,8	60	70	62,5	66	70,5	15	20,1	
60	1,3	2,2	3,0	65	75	67	71,2	76,1	9	11,4	
150						89	92	95			
600							97				

2) Dans le mélange équimoléculaire des deux isomères l'hydrolyse est sensiblement égale à la moitié de la

TABLEAU XVI.

Hydrolyses par le Pavot et la Moutarde noire à + 37°

Temps (en jours)	Pavot 0 g.,03					Moutarde noire 0 g.,20				
	pourcentage d'hydrolyse			K 10 ³		pourcentage d'hydrolyse			K 10 ³	
	α	α β } aa	β	α	β	α	β } aa	β	α	β
1	28,3	29,2	30,1	167	180	10	9	10	53,0	53,0
3	38,1	40,4	42,0	80,3	91,2	25	25,5	26	48,2	50,4
10	39,8	43,5	45,7	25,5	30,6	49,2	50,5	52,5	34,0	37,4
20	»	»	»	»	»	59,1	61,0	62,0	22,4	24,3
30	44,5	48,2	51,0			»	»	»	»	»
40	»	»	»			60,5	62,5	66,5	11,6	13,7
100	50,0	54,5	57,1							

TABLEAU XVII.

Hydrolyses par la Moutarde blanche et le Pavot à + 54°.

Temps (en heures)	Moutarde blanche 0 g.,80						Pavot 0 g.,08					
	Cm ³ de periodate M/20 nécessaires pour oxyder les fonctions α glycol libérées dans 2 cm ³			Pourcentage d'hydrolyse (en dosant P ₂ O ₅)			Cm ³ de periodate M/20 nécessaires pour oxyder les fonctions α glycol libérées dans 2 cm ³			Pourcentage d'hydrolyse (en dosant P ₂ O ₅)		
	α	α β } aa	β	α	α β } aa	β	α	α β } aa	β	α	α β } aa	β
2	0,75	1,35	2,0	4,5	5,0	5,2	1,3	2,25	3,0	7,0	8,1	7,5
4	1,0	1,9	2,9	5,9	6,8	7,8	1,6	2,5	3,5	8,0	8,4	8,7
6	1,2	2,2	3,0	6,5	7,0	8,0	1,6	2,7	3,55	7,9	8,4	8,7

TABLEAU XVIII.

Action du glycérol et des phosphates sur l'hydrolyse par la Moutarde blanche.

Glycérophosphate $\frac{M}{4}$	10 cm ³
Acide citrique.....	3 cm ³
Poudre fermentaire.....	0 g., 05
Inhibiteur.....	variable
Eau distillée q. s.....	50 cm ³

t = 37° pH 5, 7 pourcentages d'hydrolyse en dosant soit P₂O₅ libéré en présence de glycérol,
soit le glycérol libéré en présence de phosphates.

Temps (en jours)	Témoin				Concentration moléculaire en glycérol						Concentration moléculaire en phosphate						
	pourcentage d'hydrolyse			K. 10 ⁸	0,05 M		0,25 M		0,5 M		0,05 M		0,25 M		0,5 M		
	α	α } β } β	β		α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	
1	25	26,3	31,5	144	190	25,3	32,5	25,3	33,7	25,3	31	6	9	2	4	1	3
3	41	44,1	51	88,4	120	39,4	51	36,6	52	33	46	14	23	6	7	2	5
10	54	67,5	68	39	57,2	54	67,5	53,5	67,5	53,5	67,5	26	48	12	14	6	10
30	75,4	80	85	23,4	31,7				»	»	»	50	25	30	15	22	
90	80		91					92	77,5	92		60	28	32	18		
100	88	92,5	94			77			»	»							
360	99					98,5	99	99	99	99,5	99	72	62	64	58	58	

somme des pourcentages d'hydrolyse des deux formes dédoublées séparément ; ceci se retrouve en dosant soit l'acide orthophosphorique, soit le glycérol, ou encore en modifiant les conditions opératoires. Ces trois phosphatases se différencient ainsi de la taka-diastrase qui hydrolyse préférentiellement le sel β . Nous pouvons en déduire que les trois diastases de graines possèdent des affinités égales pour les deux isomères comme nous le confirmerons par la suite.

TABLEAU XIX.

Influence de la concentration en diastase (Moutarde blanche)
sur l'inhibition par les phosphates.

Phosphate de potassium M	
pH 5,8.....	12 cm ³ ,5
β glycéro $\frac{M}{4}$	10 cm ³
Acide citrique N.....	3 cm ³
Diastrase et eau q. s.....	50 cm ³
pH = 5,8 t = 37° Ces chiffres indiquent le pourcentage d'hydrolyse.	

Temps (en jours)	Dose de diastase (en g.)				
	0,01	0,05	0,10	0,20	0,25
1	1,5	4,0	5,0	7,0	9,0
3	3,0	7,0	10,0	19,0	23,0
11	4,0	14,0	27,0	40,0	48,0
30	10,0	30,0	39,0	54,0	63,0
330	69,0	—	* 96,0	* 99,0	* 99,5

(*) En dosant P₂O₅ organique non hydrolysé.

3) Dans tous les cas la vitesse de réaction, exprimée par la constante des réactions monomoléculaires, diminue notablement lorsque le pourcentage d'hydrolyse excède

20 p. 100 ; ceci peut être rapporté à l'action inhibitrice des phosphates libérés. De même que pour la taka-dia-tase la phosphatase de Moutarde est inhibée fortement par les phosphates tandis que le glycérol est sans action inhibitrice, même à une concentration moléculaire décuple de celle du substrat.

Les phosphates ralentissent seulement la vitesse de réaction sans provoquer de biosynthèse, l'hydrolyse du substrat pouvant être presque totale après un temps assez long avec de fortes doses de diastase (Tableau XIX).

4) Les pourcentages d'hydrolyse, évalués en dosant soit le glycérol soit l'acide orthophosphorique, sont sensiblement identiques ; nous n'indiquons ces calculs, à titre d'exemple, que dans le Tableau XV ; la réaction étudiée est donc certainement l'hydrolyse du glycérophosphate et non la dégradation de ce corps sous l'influence d'un système diastasique complexe qui, par exemple, pourrait le déshydrogéner puis le déphosphoryler ; les glycérophosphates sont d'ailleurs très difficilement attaquables par les déshydrogénases de graines ; il en est de même du glycérol libéré, THUNBERG [206].

5) Entre la 2^e et la 4^e heure d'hydrolyse à 54° la phosphatase du Pavot est inactivée simultanément vis-à-vis des deux substrats ; pour la Moutarde blanche cette inactivation apparaît entre la 4^e et la 6^e heure. Ces faits concordent avec l'existence d'une seule glycérophosphatase.

B) INFLUENCE DU PH SUR L'ACTIVITÉ POUR DIVERSES CONCENTRATIONS DU SUBSTRAT.

Nous avons mesuré à 37° la vitesse initiale de réaction de 0 g.,20 de poudre fermentaire de Moutarde blanche mise en contact avec 50 cm³ du substrat à des concentrations différentes, ce substrat étant amené au pH désiré par addition d'acide citrique (tableau XX). La concentration en substrat ne semble pas modifier le pH optimum qui se place vers 5,6-5,8 ; tout au plus peut-on

observer une légère tendance à un déplacement vers la zone de forte acidité lorsque la concentration en substrat décroît. Si on veut tenir compte de cette légère différence on pourrait interpréter ce faible déplacement par l'antagonisme de l'affinité et de la vitesse maxima qui varient différemment avec le pH, comme nous le verrons par la suite ; mais ces variations sont beaucoup plus faibles que pour la taka-diastrase, les modifications de la vitesse maxima en fonction du pH étant beaucoup plus importantes que celles de l'affinité.

TABLEAU XX.

Influence de la concentration en substrat sur le pH optimum de la phosphatase de Moutarde blanche ; les chiffres indiquent le nombre de γ de P_2O_5 libérés par minute.

pH	Concentration du substrat					
	M/100		M/10		M/3,33	
	α	β	α	β	α	β
4,0	30,0	30,0	»		0	0
4,2			70,0	100,0	»	»
5,2					170	200
5,4	37,5	40,0	150,0	200,0		
5,6			180,0	250,0	240	310
5,7	60,0	86,0	260,0	330,0		
5,8					320	380
5,9	66,0	80,0	190,0	260,0		
6,1	50,0	75,0	180,0	240,0	240	300
6,3			85,0	110,0		
6,5					180	240
6,7			32,5	40,0		
6,8	5	5				

Nous pouvons en outre remarquer que dans toutes les conditions le β glycérophosphate est dédoublé plus rapidement que l' α .

C) AFFINITÉ DE LA PHOSPHATASE DE MOUTARDE BLANCHE POUR LES GLYCÉROPHOSPHATES.

Nous avons mesuré la vitesse initiale d'hydrolyse à diverses concentrations du substrat pour trois pH différents : 5,3-5,8 et 6,4.

Les résultats expérimentaux sont groupée dans le tableau XXI et les données numériques calculées d'après

TABLEAU XXI.

0 g.,05 de poudre fermentaire de Moutarde blanche sont mis en contact à + 37° avec 25 cm³ de glycérophosphate à concentration variable, une solution tampon aux basses concentrations en substrat, puis de l'acide citrique pour obtenir le pH désiré. Durée d'hydrolyse variable de façon à mesurer la vitesse initiale. Vitesses initiales en γ de P_2O_5 libérés par minute.

ps = - log (S) S concentration moléculaire du substrat	pH					
	5,3		5,8		6,4	
	α	β	α	β	α	β
2,60	8,3	12,5				
2,30	16,6	20,4	7,0	10,0	1,0	1,5
2,0	20,8	23,0	15,0	20,0	3,0	4,1
1,82	24,1	28,2	20,0	25,0	—	—
1,75	27,5	31,5	—	—	—	—
1,69	31,6	39,0	25,0	27,0	—	—
1,60	35,0	41,6	29,0	36,0	10,0	11,5
1,50	—	—	36,0	41,0	—	—
1,42	—	—	42,0	50,0	—	—
1,30	43,0	45,0	50,0	53,5	12,0	15,0
1,12	—	—	—	—	14,6	16,7
1,0	49,0	56,0	62,5	65,0	20,0	25,0
0,89	52,6	59,4	65,0	75,0	—	—
0,83	55,5	62,5	70,0	80,0	28,6	33,3
0,80	—	—	71,0	79,0	—	—
0,76	47,5	50,0	—	—	—	—
0,75	—	—	—	—	29,0	32,5
0,70	40,0	43,0	46,0	54,0	28,5	33,3

ces expériences dans le tableau XXII. Nous pouvons en tirer diverses déductions :

1) L'affinité est identique pour les deux isomères ; elle croit de façon semblable quand l'acidité augmente. Ce double caractère s'oppose à ce que nous avons observé avec la taka-diastrase où les affinités différentes vis-à-vis des deux isomères varient d'une façon inégale en fonction du pH.

TABLEAU XXII.

Valeurs calculées à partir des données du tableau XXI.

pH	5,3	5,8	6,4
Affinité K_M pour l' α glycérophosphate	57,1	32	13,3
Affinité K_M pour le β glycérophosphate	57,1	32	13,3
$\frac{K_M \beta}{K_M \alpha}$	1	1	1
Vitesse initiale optima de l' α (γ de P_2O_5 minute)	55,5	71	29
Vitesse initiale optima du β (γ de P_2O_5 min.)	62,5	80	33,3
$\frac{v. \max \beta}{v. \max \alpha}$	1,13	1,14	1,14

2) La vitesse initiale maxima d'hydrolyse est toujours plus grande pour le β que pour l' α ; cette vitesse passe par un maximum vers pH 5,8. Le rapport des vitesses initiales optima $\frac{v \beta}{v \alpha}$ est sensiblement indépendant du pH comme nous l'avons déjà observé avec la taka-diastrase. Les variations identiques en fonction du pH des vitesses

maxima pourraient constituer des arguments en faveur de l'existence d'une seule glycérophosphatase à affinités égales vis-à-vis des deux isomères mais dédoublant plus rapidement le β glycérophosphate par suite d'une activité réactionnelle plus grande des groupes actifs vis-à-vis de cet isomère.

D) ACTION DES PHOSPHATASES DE GRAINES SUR UN MÉLANGE DE GLYCÉROPHOSPHATES.

La phosphatase de Moutarde blanche présente des affinités égales vis-à-vis des deux glycérophosphates. Dans un mélange des deux formes l'hydrolyse de chaque glycérophosphate doit donc être proportionnelle au pourcentage de cette forme dans le mélange. L'expérience a confirmé ces déductions théoriques (Tableau XXIII).

TABLEAU XXIII.

0 g ,05 de poudre fermentaire de Moutarde blanche sont mis en contact 6 heures à 37° avec 20 cm³ d'eau et 30 cm³ d'un mélange d' α et β glycérophosphates $\frac{M}{8}$ amenés à pH 5,8 par addition d'acide citrique et 20 cm³ d'eau.

	1	2	3	4	5
Pourcentage de l' α glycérophosphate	100	75	50	25	0
Pourcentage du β glycérophosphate	0	25	50	75	100
mg. de P ₂ O ₅ libérés dans 30 cm ³	18,0	19,0	20,5	22,0	23,0
cm ³ de periodate $\frac{M}{20}$ consommés par les fonctions α glycol libérées dans 5 cm ³	0,8	1,1	1,6	1,9	2,2

Additionnons deux à deux les quantités soit d'acide orthophosphorique soit de glycols- α libérés dans les

colonnes 1 et 5 ; nous avons les sommes des quantités libérées avec 100 parties de chacun des deux isomères hydrolysés indépendamment l'un de l'autre. Additionnons les chiffres des colonnes 2 et 4 où les isomères sont dans les proportions respectives 3/1 et 1/3, nous avons encore 100 parties de chaque forme. Si les deux formes sont hydrolysées proportionnellement à leurs concentrations respectives dans le mélange les quantités de produits d'hydrolyse libérés dans $1 + 5$ doivent être égales à celles libérées dans $2 + 4$ ou $3 + 3$, ce qui se vérifie aux erreurs d'expérience près. Une expérience analogue avec la Moutarde noire (Tableau XXIV) conduit à des résultats semblables. En inversant le raisonnement précédent nous pouvons en déduire que puisque les deux glycérophosphates sont hydrolysés proportionnellement à leurs concentrations respectives dans le mélange, la phosphatase de Moutarde noire présente des affinités égales vis-à-vis des deux isomères, mais il faut admettre qu'elle possède des groupes actifs dédoublant plus rapidement le β glycérophosphate.

TABLEAU XXIV.

0 g. 05 de poudre fermentaire de Moutarde noire sont mis en contact 24 heures à 37° avec 20 cm³ d'eau et 30 cm³ d'un mélange d' α et β glycérophosphates $\frac{M}{8}$ amenés à pH 5,8 par addition d'acide citrique.

	1	2	3	4	5
Pourcentage en α glycérophosphate	100	75	50	25	0
Pourcentage en β glycérophosphate	0	25	50	75	100
mg. de P ₂ O ₅ libérés dans 25 cm ³	12,0	12,5	13,5	15,0	16,0
cm ³ de periodate $\frac{M}{20}$ consommés par les fonctions α glycol libérées dans 5 cm ³	0,65	1,0	1,2	1,45	1,8

E) INFLUENCE DE DIVERS COMPOSÉS CHIMIQUES SUR
L'HYDROLYSE DES DEUX GLYCÉROPHOSPHATES.

Afin de comparer la phosphatase A_2 des graines à la phosphatase A_3 de la taka-diastrase nous avons utilisé les mêmes corps au cours d'expériences similaires.

1) *Action de doses variables de divers composés chimiques sur la phosphatase de Moutarde blanche.*

Nos expériences sont décrites dans le tableau XXV ; elles permettent d'effectuer diverses observations :

1) Les divers corps influent de façon semblable sur l'hydrolyse des deux glycérphosphates, le β étant toujours hydrolysé le plus rapidement.

2) L'action inhibitrice croît avec la concentration en inhibiteur.

3) Les arsénates et les fluorures à de faibles concentrations, l'alcool et le glycérol à de fortes doses, sont d'énergiques inhibiteurs.

4) Les diastases inactivées et le chlorhydrate de quinine sont faiblement inhibiteurs.

5) La strychnine, l'o-oxyquinoléine et les sels de magnésium sont pratiquement sans action ; le magnésium, aux doses employées, n'est pas un activateur de ces phosphatases de graines ; d'autre part ces diastases peuvent être conservées en utilisant l'o-oxyquinoléine comme antiseptique.

2) *Action de doses constantes de divers composés chimiques sur l'affinité de la phosphatase de Moutarde blanche.*

Nous avons étudié les corps dont l'action avait été précédemment étudiée sur la taka-diastrase. Le tableau XXVI contient les données expérimentales et le tableau XXVII les valeurs calculées d'après ces données.

TABLEAU XXV.

Action de divers composés chimiques sur la phosphatase de Moutarde blanche.

Glycérophosphate	M	20 cm ³
Acide citrique N q. s.	pH 5,8	
Poudre fermentaire	0 g.,05	
Eau distillée + inhibiteur q. s.	50 cm ³	

Les chiffres indiquent le nombre de mg. de P₂O₅ libérés en 4 h. à 37° et pH 5,8.

Concentration moléculaire en inhibiteur	Témoin	Emulsine d'Amande inactive	Taka- diastase inactive	Nitrate de strychnine	Fluorure de sodium	Nitrate de magnésium (1)	Chlorhydrate de quinine
α glycéro- phosphate	15,5	12,5	12	10	16	14	10
β glycéro- phosphate	18	16	17	13	17	18	13

Concentration moléculaire en inhibiteur	Chlorhydrate d'o-oxyquinoléine	Arséniate de sodium	Ethanol à 95°	Glycé- rol
α glycérophosphate...	13	7,1	8	4,5
β glycérophosphate...	17	8,5	10	4,5

(1) La poudre fermentaire de Moutarde blanche contient Ca 13 mg.,5 et Mg 0 mg.,3 par g., soit une concentration 1,25 10⁻³ M en Mg dans le témoin.

TABLEAU XXVI.
Action de divers inhibiteurs sur l'affinité de la Moutarde blanche.
Poudre fermentaire de Moutarde blanche 0 g., 05, pH 5, 6, t = 37°, Volume total 50 cm³.

Concentration en inhibiteur	Témoin		Phosphate de potassium M/50				Fluorure de sodium M/500				Nitrate de strychnine M/250			
	vitesse en γ de P_2O_5 libérés par minute		γ de P_2O_5 par minute		vitesse relative (2)		γ de P_2O_5 par minute		vitesse relative (1)		γ de P_2O_5 par minute		vitesse relative (1)	
	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β
0,0025	"	"	"	"	"	"	8,0	10,0	>100	>100	4,0	6,0	117	133
0,0037	"	"	"	"	"	"	9,0	11,0	>100	>100	"	"	112	112
0,005	11,0	11,0	"	"	"	"	14,0	16,0	145	145	"	"	100	100
0,0075	43,0	46,0	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	100	100
0,0087	"	"	"	"	"	"	14	19,5	64	77	"	"	100	100
0,01	22	25,0	"	"	"	13	"	"	"	"	"	"	100	100
0,0125	27	30	"	"	"	"	16	22	60	73	"	"	100	100
0,0187	"	"	"	"	"	"	17	23	50	57	"	"	100	100
0,025	45	53,3	"	"	"	"	20	24	44,5	45	"	"	100	100
0,0374	56,6	70,0	"	"	"	"	24	26	38	35	"	"	100	100
0,05	"	"	"	"	"	"	24	26	38	35	"	"	100	100
0,075	66,6	80,0	"	"	"	"	22	25	33	31	"	"	100	100
0,08	66,6	76,6	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	100	100
0,1	53,3	63,3	"	"	"	"	21	22,5	"	"	69	82	100	100
0,12	"	"	"	"	"	"	"	"	"	"	78	89	100	100
							"	"	"	"	72	83	100	100

(1) La vitesse relative est le rapport (v initiale avec inhibiteur/v initiale du témoin) $\times 100$.
(2) Avec le phosphate le volume total est de 25 cm³.

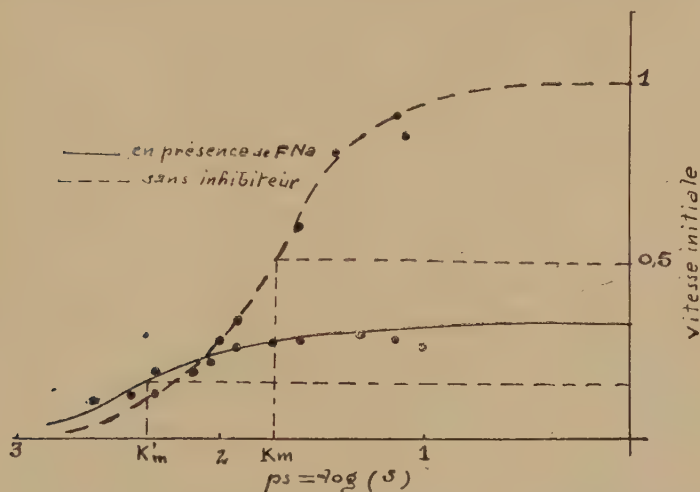
TABLEAU XXVII.
Valeurs calculées à partir des données du tableau XXVI.

Inhibiteur	Témoin	Phosphate de potassium	Fluorure de sodium	Nitrate de strychnine
Affinité K_M pour l' α glycérophosphate				
	abscisses arithmétiques	50	115	44
	abscisses logarithmiques	44, 6	125	44, 6
Moyenne	47, 5	20	120	44, 3
Affinité K_M pour le β glycérophosphate				
	abscisses arithmétiques	50	250	50
	abscisses logarithmiques	44, 6	230	44, 6
Moyenne	47, 5	20	240	47, 5
Vitesse optima d'hydrolyse de l' α glycérophosphate (en γ de P_2O_5 libérés par minute)	66, 6	> 6, 2	24	78
Vitesse optima d'hydrolyse du β glycérophosphate (en γ de P_2O_5 libérés par minute)	80	> 8, 2	26	89

Nous pouvons en tirer un certain nombre de déductions :

1) Dans l'expérience témoin à pH 5,6 l'affinité vis-à-vis des deux isomères est de 47,5 avec une concentration de 1 p. 1000 en diastase. Avec une concentration de 2 p. 1000 de la même préparation fermentaire nous avons obtenu (tableau XXI) $K_M = 57$ à pH 5,3 et $K_M = 32$ à pH 5,8. Nous pouvons ainsi vérifier à nouveau que l'affinité est indépendante de la concentration en diastase.

2) Les *phosphates* qui se comportent principalement comme des inhibiteurs concurrents de la taka-diastase sont surtout des inhibiteurs absolus de la Moutarde.



COURBE 6. — Action du fluorure de sodium sur l'hydrolyse du β -glycérophosphate par la phosphatase de Moutarde blanche. (S) = concentration moléculaire du substrat.

3) Le mécanisme d'action du *fluorure de sodium* différencie la phosphatase A_2 de Moutarde de la phosphatase A_3 de la taka-diastase. Avec la Moutarde nous pouvons observer que le fluorure augmente l'affinité ce qui se traduit par une inhibition proportionnelle à la concentration du substrat. Il en résulte donc ce fait para-

doxal qu'une même dose de fluorure inhibe, l'hydrolyse de fortes doses de substrat mais accélère par contre l'hydrolyse de faibles doses ; le fait est particulièrement net avec le β glycérophosphate comme le montre la courbe.

Ainsi le fluorure, inhibiteur concurrent de la phosphatase A_3 de la taka-diastrase, augmente au contraire la stabilité de la combinaison enzyme-substrat de la phosphatase de Moutarde. Nous reviendrons sur ce fait en étudiant la phosphatase d'Amande qui se comporte comme celle de Moutarde.

4) La *strychnine*, inhibiteur absolu et concurrent de la taka-diastrase, ne modifie pas l'affinité de la Moutarde et accroît légèrement son action hydrolysante ; ce fait permet de séparer à nouveau les phosphatases A_2 et A_3 .

5) D'une façon générale ces trois corps influent d'une façon semblable sur l'hydrolyse des deux glycérophosphates ce qui concorde avec l'existence d'une seule glycérophosphatase.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE I.

La phosphatase A_2 des graines hydrolysant le β glycérophosphate plus rapidement que l' α est une glycérophosphatase mixte présentant des affinités égales vis-à-vis des deux isomères mais possédant des groupes actifs dédoublant plus rapidement la forme β . Vis-à-vis des deux isomères les affinités croissent d'une façon égale avec l'acidité du milieu, tandis que les variations des vitesses maxima en fonction du pH sont différentes.

Cette phosphatase A_2 , inhibée par les phosphates arséniates et fluorures, est insensible à l'action de faibles doses de sels de magnésium et de glycérol. Le mécanisme d'action des composés chimiques différencie cette phosphatase A_2 de la diastase A_3 de la taka-diastrase. Au cours de l'étude de la phosphatase A_2 d'Amande nous reviendrons sur les différences entre ces deux types de phosphatases (Chapitre II).

CHAPITRE II.

ÉTUDE DES PHOSPHATASES DE GRAINES HYDROLYSANT LES DEUX GLYCÉROPHOSPHATES A DES VITESSES SENSIBLEMENT IDENTIQUES.

Nos recherches ont porté presque exclusivement sur la phosphatase d'Amande douce (émulsine). Poursuivant toujours le même but : comparer les phosphatases de graines à celle de la taka-diaстase, nous avons tout d'abord étudié l'influence de la température et de la durée de la réaction sur l'hydrolyse des deux isomères. Nos recherches ont porté ensuite sur l'influence : des tampons, du pH sur l'inactivation, de la concentration en substrat et de divers composés chimiques.

A) INFLUENCE DE LA DURÉE D'HYDROLYSE A DIVERSES TEMPÉRATURES.

Nos expériences sont analogues à celles réalisées avec les autres phosphatases de graines. Nous avons comparé l'hydrolyse de solutions pures des deux glycérophosphates et de leur mélange équimoléculaire par les phosphatases de Haricot et d'Amande (Emulsine HÉRISSEY) ; ces essais ont été effectués à la température ordinaire, à 37° et 54°. Enfin avec l'émulsine nous avons fait une expérience en présence des produits d'hydrolyse. Les résultats obtenus sont identiques ; nous avons groupé les plus caractéristiques dans les tableaux XXVIII et XXIX qui permettent d'effectuer les observations suivantes :

1) Les deux isomères, isolés ou non, sont dédoublés à des vitesses sensiblement égales dans toutes les con-

TABLEAU XXVIII.
Hydrolyses par la phosphatase du Haricot.

Temps (en jours)	Macération à 10 p. 100 : 10 cm ³ t = 20°						Macération à 10 p. 100 : 20 cm ³ t = 37°						
	Cm ³ de périodate M/20 nécessaires pour oxy- der les α glycols libé- rés dans 2 cm ³ .			Pourcentage d'hydrolyse (en dosant P ₂ O ₅ libéré)			Cm ³ de périodate M/20 nécessaires pour oxy- der les α glycols libé- rés dans 2 cm ³ .			Pourcentage d'hydrolyse (en dosant P ₂ O ₅ libéré)			
	α	α { aa β	β	α	α { aa β	β	α	α { aa β	β	α	α { aa β	β	
1	0,5	0,7	0,9	20	21,5	21	0,8	1,1	1,6	38	39	39	244
3	0,6	0,9	1,2	28,5	28	28	1,1	1,6	2,1	51,2	50,5	50,5	119
10	1,1	1,6	2,1	48,5	51	49	1,6	2,2	3,0	76,3	75,5	76	71,7
30	1,7	2,5	3,3	81,5	80	81	1,8	2,7	3,7	90	90	89	38,5
100				98	97,5	98				98,5	97	98	

TABLEAU XXIX.
Hydrolyse par la phosphatase d'Amande.

Temps (en jours)	Concentration en inhibiteur												
	Témoin			Glycérol						Phosphate de potassium pH 5,7			
				0,05 M		0,25 M		0,5 M					
				α	β	α	β	α	β				
1	39	40	252	40	38	40	38	48	17	—	—	3	4
3	64,5	66	477	59	65	65	64	36	34	6	7	12	8
40	81,0	79,5	84,6	78	76	75	73	50	45	30	27	20	20
33	89	87	32,3	»	»	»	»	60	60	—	—	40	40
45	90	90		87	88,5	87	88,5	78	71	62	—	50	53
90	99	97		»	»	»	»	99,5	99	99	—	99,5	98
360	100	100		»	»	»	»	»	»	»	»	»	»

Glycérophosphate $\frac{M}{4}$10 cm³

Acide citrique N.....3 cm³

Emulsine.....0 g., 05

Eau distillée + inhibiteur q. s.....50 cm³

Les chiffres expriment les pourcentages d'hydrolyse à 37° et pH 5,7

Les chiffres expriment les pourcentages d'hydrolyse à 37° et pH 5,7

ditions : température et durée d'hydrolyse variables, présence ou non de glycérol et phosphates. Ainsi tout se passe comme s'il s'agissait d'une seule glycérrophosphatase non spécifique.

2) Dans un mélange équimoléculaire des deux isomères les deux corps sont dédoublés à des vitesses égales.

3) Les phosphates libérés ralentissent progressivement la vitesse de réaction mais ne modifient pas l'équilibre final ; l'hydrolyse peut être totale en présence de fortes doses de phosphates. Le glycérol, par contre, même à une concentration moléculaire décuple de celle du substrat, est sans action inhibitrice.

4) A 54° l'émulsine est encore active après six heures de réaction ; après deux heures la phosphatase de Haricot est inactivée vis-à-vis des deux isomères ; ceci confirme la relative thermostabilité de l'émulsine, que nous avons signalée avec P. FLEURY [76].

B) INFLUENCE DU TAMPON SUR LE pH OPTIMUM DE L'ÉMULSINE.

BAMANN et son école [19, 20] ont mis en évidence l'influence du tampon sur le pH optimum des phosphatases animales et de la taka-diastrase, ce qui permet de différencier les phosphatases coexistant dans une même préparation. Nous avons déterminé le pH optimum de la phosphatase d'Amande avec des tampons différents ; le glycérrophosphate de soude a été amené au pH désiré par l'un des acides suivants : citrique, sulfurique ou phtalique (sel acide de K).

L'ensemble de nos résultats (tableau XXX) montre que la nature de l'acide est pratiquement sans influence :

a) sur le pH optimum qui se place vers 5,5-5,6.

b) sur la vitesse d'hydrolyse pratiquement indépendante de la nature du tampon ; l'acide citrique qui se trouve à de fortes concentrations dans la zone la plus acide exerce cependant une légère inhibition.

TABLEAU XXX.

0 g.,05 d'émulsine HÉRISSEY sont mis en contact à 37° avec 50 cm³ de liquide contenant 10 cm³ de substrat $\frac{M}{6}$ et une solution acide. Les chiffres indiquent le nombre de mg. de P₂O₅ libérés en 5 heures.

pH	Acide utilisé					
	Citrique		Sulfurique		Phtalique	
	α	β	α	β	α	β
3,2			traces	traces		
4,0	13	13,5	8			
4,2		18		9		
4,4	26					
4,5					23	22
4,7					29	29
4,8		28	29	29		
5,0	31					
5,1		32			33	33
5,3	33					
5,4				30		34
5,5			31		33	
5,6	35	34	32		34	35
5,7				31		
5,8		34	32	33	31	33
6,0	32					
6,1		25	30		30	30
6,2	28			27		
6,3					24	25
6,6	17	18	20	21		
6,7	15					
6,8		13			20	21
6,9			11			
7,1	1	1				

c) sur l'hydrolyse des deux formes dédoublées à des vitesses égales dans toutes conditions, ce qui correspond bien à l'existence d'une glycérophosphatase non spécifique.

C) INACTIVATION DE LA PHOSPHATASE D'AMANDE EN FONCTION DU pH.

Les phosphatases de types différents présentent des courbes d'inactivation en fonction du pH assez voisines, les légères divergences permettent cependant de les différencier par inactivation sélective (page 15). Nous avons recherché s'il était possible de séparer ainsi une α et une β glycérophosphatase d'Amande.

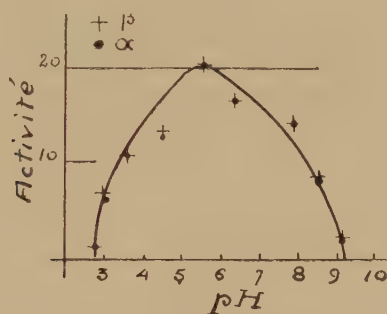
TABEAU XXXI.

Inactivation de la phosphatase d'Amande en fonction du pH.

Tampon	pH	α	β
Phtalate + ClH.....	2,2	0	0
Acide citrique + NaOH	2,5	0	0
Phtalate + ClH.....	2,6	0	0
Acide citrique + NaOH....	2,7	1	1
id.	3,0	6,5	7,0
id.	3,6	11,0	11,0
id.	4,5	12,5	13,25
id.	5,6	20,5	20,5
id.	6,4	16,0	16,0
Glycine + NaOH	7,9	14,0	14,0
id.	8,6	7,0	8,0
id.	9,1	1,5	2,0
id.	9,75	0	0
Témoin.....		20	19,5
Témoin + 5 cm ³ glycine N/10		21	22
Témoin + 10 cm ³ glycine N/10.....		21	21,5

On maintient 0 g.,12 d'émulsine 30 minutes à 37° avec 40 cm³ de solution tampon, la solution refroidie

est ajustée à pH 5,6 et diluée à 60 cm³ ; 10 cm³ (0 g.,02 de diastase) sont mis à réagir à 37° avec 10 cm³ de substrat M/6 de pH 5,6 et 30 cm³ d'eau. Les chiffres du tableau XXXI indiquent le nombre de mg. de P₂O₅ libérés en 6 heures. La courbe adjointe représente la courbe d'inactivation en fonction du pH. L'inactivation en fonction du pH est absolument identique vis-à-vis des deux isomères : pratiquement nulle au pH optimum 5,6 elle croît lentement dans la zone acide et un peu plus rapidement dans la zone alcaline.



COURBE 7. — Inactivation de la phosphatase d'Amande en fonction du pH.

Comme nous avons utilisé des tampons à la glycine nous avons vérifié que cet amino-acide ne modifiait sensiblement pas l'action hydrolysante de la phosphatase A₂ qui se différencie ainsi des phosphatases A₁ activables par les amino-acides (page 23).

D) AFFINITÉ DE LA PHOSPHATASE D'AMANDE POUR LES GLYCÉROPHOSPHATES.

Nous avons déterminé cette affinité à trois pH différents 5,3-5,8 et 6,3. Les données expérimentales sont classées dans le tableau XXXII et les valeurs déduites de ces expériences dans le tableau XXXIII.

TABEAU XXXII.

Mesure de l'affinité de la phosphatase d'Amande à divers pH.

Emulsine..... 0 g.,05

Glycérophosphate et tampon, q. s..... 50 cm³

Vitesse initiale en γ de P₂O₅ libérés par minute.

p s = - log (S) (S) concentration molaire du substrat	pH					
	5,3		5,8		6,4	
	α	β	α	β	α	β
2,30		18				
2,0		29		25		
1,82		32				
1,75		44				
1,69	47	47		46		
1,65				52		
1,60	50	51	54	54		30,5
1,48					38,8	38,8
1,42			62,5	62,5		41
1,30	60	60	70,8	70,8	46	44
1,12					50	53
1,0		66,6		85		58,5
0,82		78		91,6		
0,76		87,5				
0,74				100	77	76
0,70		75	80	83,5		83
0,61						83
0,55						55

TABLEAU XXXIII.

D'après les données du tableau XXXII.

pH	5,3	5,8	6,4
Affinité K_m pour l' α glycérophosphate....	57,1	46,6	25,0
Affinité K_m pour le β glycérophosphate...	57,1	46,6	25,0
Vitesse optima d'hydrolyse des deux isomères (en γ de P_2O_5 libérés par minute)	87,5	100	83

TABLEAU XXXIV.

0 g.,02 d'émulsine sont mis en contact 6 heures à + 37° avec 30 cm³ de glycérophosphates $\frac{M}{8}$ à pH 5,8 et 20 cm³ d'eau.

	1	2	3	4	5
Pourcentage de l' α glycérophosphate.....	100	75	50	25	0
Pourcentage du β glycérophosphate	0	25	50	75	100
mg. de P_2O_5 libérés dans 25 cm ³	17,5	18	17,5	18	18
cm ³ de periodate $\frac{M}{20}$ consommés pour oxyder les fonctions α -glycol libérées dans 5 cm ³ ...	1,15	1,5	1,65	1,8	2,2

Nous pouvons en tirer les conclusions suivantes :

1) Les deux glycérophosphates sont hydrolysés à la même vitesse, ceci quel que soit le pH ou la concentration en substrat ; il en résulte que les affinités et vitesses optima sont identiques aux divers pH ; tout se passe comme s'il s'agissait d'une seule glycérophosphatase non spécifique.

2) L'affinité de la phosphatase croît avec l'acidité du milieu ; les variations d'affinité sont un peu plus faibles que pour la Moutarde blanche mais les chiffres sont du même ordre de grandeur ; de même que pour la Moutarde la vitesse maxima d'hydrolyse est plus élevée à pH 5,8 qu'aux deux autres pH. La phosphatase d'Amande présentant des affinités égales pour les deux isomères, dans un mélange des deux formes l'hydrolyse de chaque isomère doit être proportionnelle à sa concentration dans le mélange, ce que l'expérience (tableau XXXIV) a confirmé. L'interprétation de ce tableau effectuée de la même façon que pour la Moutarde blanche conduit aux mêmes conclusions.

E) ACTION DE DIFFÉRENTS COMPOSÉS CHIMIQUES.

Nos expériences sont analogues à celles réalisées sur la Moutarde blanche :

1) *Action de doses variables de divers composés chimiques.*

Les expériences rapportées dans le tableau XXXV permettent de faire les observations suivantes :

1) Quelles que soient les variables, elles influent de façon semblable sur l'hydrolyse des deux isomères.

2) Les réactions des phosphatases d'Amande et Moutarde sont identiques : à de faibles doses la strychnine est faiblement activante, les sels de magnésium sont faiblement inhibiteurs, le fluorure et l'arséniate de sodium

Glycérophosphate	$\frac{M}{8}$	20 cm ³
Acide citrique N, q. s.		pH 5,8
Emulsine.		0 g.,05
Eau distillée + inhibiteur, q. s.		50 cm ³

Ces chiffres indiquent le nombre de mg. de P₂O₅ libérés en 4 heures à + 37° et pH 5,75.

Concentration moléculaire de l'inhibiteur	Phosphatase inactivée de Montarde blanche		taka-diastase inactivée		nitrate de strychnine		fluorure de sodium			nitrate de magnésium		
	Témoin (1)	0 g., 10	0 g., 20	0 g., 40	0 g., 20	2, 10-4	2, 10-3	2, 10-4	2, 10-3	2, 10-4	2, 10-3	4, 10-2
α glycéro- phosphate	18	18	18	16	14	18,5	17	11,5	6,5	2,5	13	11
β glycéro- phosphate	18,25	18	18	16	14	19	16	11,5	6,5	2,0	13	11
Concentration moléculaire en inhibiteur	chlorhydrate de quinine		chlorhydrate d'o-oxyquinoline		Arséniate de soude pH 5,75		Ethanol à 95 p. 100			Glycé- rol		
	2, 10-3	2, 10-2	2, 10-4	2, 10-3	1, 10-2	2, 10-2	5, 10-3	2, 10-2	20 cm ³	45 cm ³	20 cm ³	25 cm ³
α glycéro- phosphate	18	13	16	17	15	13	5,9	3,5	11	8,10	2	4
β glycéro- phosphate	18	13,5	17	17,5	15	12	5,6	3,5	10,5	8,5	2,5	3,5

(1) 1 g. d'émulsine contient 5 mg.,5 de Ca et 0 mg.,15 de Mg, ce qui fait une concentration 5,6.10⁻⁶ M en Mg dans les solutions témoins.

Diastase.....
Glycérophosphate, inhibiteur et eau, q. s.
Vitesse en γ de P_2O_5 libé

Concen- tration en inhibiteur	Témoin		Alcool à 90° 10 cm ³			Glycérol 20 cm ³			FNa M/500	
	γ de P_2O_5		γ de P_2O_5		Vitesse (1) relative	γ de P_2O_5		Vitesse relative	γ de P_2O_5	
	α	β	α	β		α	β		α	β
2,60						9,3	9,3		11	12,5
2,30		38				10,4	10,0	27	19,5	22
2,12	45	45	19,4	19,4	43					
2,05						12,5	12			
1,90	46	46		23,6	51	13,5	14,5	31	26	26
1,73		50	27,7	27,7	55					
1,60	53,7	53,7	30,6	30,6	57	16,6	18,7	33	26,6	27,5
1,42		58,3	36,2	36,2	62	18,6		32	29,2	28,5
1,30	67	67	37,5	39	57	22	23,5	34	31,3	31,3
1,20						21	20	30	34	33
1,12	80	80		43	53,5		19		27,5	29
1,05			53		52					
	87	93,3		47	51		16,6	18,5	21	21
0,92			39	38						
0,83										
0,70										
0,52										
0,40										
0,30										

(1) La vitesse relative est le rapport (vitesse initiale avec inhibiteur/vitesse initiale du témoin) $\times 100$.

(2) S = concentration moléculaire du substrat.

I.
à 37° et pH 5,6.

Strychnine M/250		Taka-diastrase inactivée 0 g., 20			Arséniate M/50			Phosphate M/5		
P ₂ O ₅		γ de P ₂ O ₅		Vitesse relative	γ de P ₂ O ₅		Vitesse relative	γ de P ₂ O ₅		Vitesse relative
α	β	α	β		α	β		α	β	
33,3		16	16	43						
		20	20	44						
41,7	86	24,7	24,7							
45	98	29,1	29,1	63,5						
53	100	41	37,5	73	7,5		14			
		49	53	80						
71	104	61	58	88	14,8	14,8	22	6	6	9
83	103	66,4	66,4	83	27,5	25	33	8	9	11
72,2	83	70	70	77	47	49	54	11	10	13
					51	50		13	13	14
					47	45		14,5	13,5	14
								15	16	16
								17	17	17
								19	18,5	19

le sont fortement. L'o-oxyquinoléine, la quinine ne sont inhibitrices qu'à des concentrations relativement élevées, il en est de même pour les fortes doses d'alcool et glycérol. Les phosphatases de spécificité différente inactivées demeurent sans action (Moutarde) ou sont légèrement inhibitrices (taka-diastrase). Les résultats similaires obtenus avec ces deux diastases actives et d'autres phosphatases inactivées nous permettent de conclure que la spécificité d'action vis-à-vis des deux glycérophosphates n'est pas orientée par des substances thermostables.

2) *Action de divers composés chimiques sur l'affinité de la phosphatase d'Amande.*

Ces mesures effectuées dans les mêmes conditions que précédemment (tableaux XXXVI et XXXVII) permettent de présenter les observations suivantes :

1) A pH 5,6 l'expérience témoin permet de calculer que l'affinité vis-à-vis des deux isomères est de 51,5 en utilisant une concentration de 1 p. 1000 en émulsine. Au cours des expériences décrites antérieurement (tableau XXXIII) à la concentration en émulsine de 2 p. 1000 nous avons obtenu : $K_M = 57$ à pH 5,3 et $K_M = 46$ à pH 5,8. L'affinité de l'émulsine comme celle des deux autres phosphatases précédemment étudiées est donc indépendante de la concentration en substrat.

2) Les différents corps influent de façon semblable sur l'hydrolyse des deux isomères, hydrolysés à des vitesses sensiblement égales quelles que soient les variables : composé chimique, concentration en substrat.

3) Les *arsénates* sont des inhibiteurs concurrents comme pour la taka-diastrase ; par contre les phosphates inhibiteurs concurrents nets de la taka-diastrase sont principalement des inhibiteurs absolus de l'émulsine qui se comporte ainsi comme la Moutarde blanche.

TABEAU XXXVII.

Valeurs calculées d'après le tableau XXXVI.

Inhibiteur		Témoïn	Alcool	Glycérol	Fluorure	Strychnine	Taka-diaslase	Arséniate	Phosphate
Affinité pour l' α glycérophosphate	abscisses log.	50	32	50	250	50	44	12,5	7
	abscisses arithmétiques	53	33,3	50	environ	50	44,4	12,5	8
	moyenne	51,5	32,5	50		50	44	12,5	7,5
Affinité pour le β glycérophosphate	abscisses log.	50	32	50	250	50	44	12,5	7
	abscisses arithmétiques	53	33,3	50	environ	50	44,4	12,5	8
	moyenne	51,5	32,5	50		50	44	12,5	7,5
Vitesse optima d'hydrolyse des 2 formes (en γ de P_2O_5 libérés par minute).....		94	53	23,5	34	83	70	51	19

4) L'alcool et le *glycérol* à fortes doses agissent surtout comme des inhibiteurs absolus ; l'alcool exerce cependant une légère inhibition concurrente ce qui différencie l'émulsine de la taka-diastase, dont l'alcool augmente faiblement l'affinité.

5) Le *fluorure*, inhibiteur concurrent de la taka-diastase, augmente fortement l'affinité de la phosphatase d'Amande. Cette propriété semble générale aux phosphatases végétales A_2 ; nous l'avons signalée plus haut avec la Moutarde blanche et PFANKUCH [173] a observé que l'inhibition de la phosphatase de Pomme de terre par le fluorure augmentait avec la concentration en substrat.

6) La *strychnine*, inhibiteur concurrent et absolu de la taka-diastase, ne modifie pas l'affinité de la phosphatase d'Amande et exerce même une légère action activante.

7) Enfin la *taka-diastase* contient des inhibiteurs légèrement concurrents.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE II.

La phosphatase d'Amande ne semble contenir qu'une seule glycérphosphatase non spécifique possédant une affinité identique pour les deux isomères.

En effet les deux glycérphosphates en solutions équimoléculaires sont hydrolysés à des vitesses égales quelles que soient les conditions opératoires : durée, température et pH de la réaction, concentration variable du substrat en solutions pures ou en présence de composés chimiques. L'inactivation en fonction du pH est identique vis-à-vis des deux isomères. La phosphatase A_2 d'Amande présente les mêmes caractères généraux que la phosphatase A_2 de Moutarde blanche : pH optimum identique, affinités semblables pour les deux isomères, légère inhibition par les sels de magnésium et faible accélération par la strychnine, inhibition par le fluorure proportionnelle à la concentration du substrat. Ces divers

caractères différencient ces phosphatases A_2 de la phosphatase A_3 de la taka-diastrase avec laquelle elles présentent certains caractères communs : action inhibitrice des phosphates et arsénates, insensibilité à l'action de faibles doses de glycérol, affinité croissant avec l'acidité du milieu et variant d'une façon différente de la vitesse maxima d'hydrolyse.

CHAPITRE III.

ACTION DE PRÉPARATIONS D'AMANDE DOUCE DE PURETÉ VARIABLE SUR LES GLYCÉROPHOSPHATES.

Le principal argument des enzymologistes distinguant des α et β glycérophosphatases spécifiques repose sur le fait qu'il est possible d'obtenir des préparations de spécificité variable à partir de la même matière première. Tout en cherchant à isoler des échantillons purifiés de phosphatase d'Amande douce nous avons comparé l'action des diverses préparations d'Amande sur les α et β glycérophosphates. D'une façon générale les préparations ont été obtenues par trois voies différentes :

- a) extraction à différents pH et précipitation ;
- b) par les techniques d'adsorption ;
- c) par préadsorption.

1) PRÉPARATIONS FERMENTAIRES OBTENUES PAR EXTRACTION A DIFFÉRENTS pH ET PRÉCIPITATION.

On tend à substituer à l'ancienne notion de diastase « ferment soluble » ou plus spécialement hydrosoluble une conception plus souple. Les recherches de WILLS-TÄTTER et ROHDEWALD [218] ont conduit à subdiviser les diastases en *lyoenzymes* directement extractibles par l'eau et *desmoenzymes* où le groupe actif serait associé à un support de haut poids moléculaire insoluble dans l'eau. La solubilité est sous la dépendance de ce support et l'autolyse qui le dégrade transforme en général les desmoenzymes en lyoenzymes. Certains réactifs chimi-

qués ou des modifications de la réaction du milieu peuvent également « solubiliser » les diastases : solvants organiques sur les glucidases végétales, PARIS [171], acide acétique sur l'estérase hépatique, BAMANN, MUKHERJEE et VOGEL [15], ammoniacque sur la β glucosidase d'Amande, WILLSTÄTTER et CSANYI [213].

En vue de rechercher si la phosphatase d'Amande était ou non un lyoenzyme nous avons étudié son extraction à différents pH en utilisant particulièrement des solutions de phosphates, qui possédant une certaine affinité pour la diastase pouvaient l'éluer du desmoenzyme possible.

Nous décrirons successivement les techniques de préparation de nos divers échantillons diastasiques, la mesure de leur activité et nous discuterons finalement les résultats obtenus.

A) *Techniques de préparation des divers échantillons.*

Nous subdiviserons ces techniques selon la réaction de la solution aqueuse employée : neutre, acide et alcaline.

a) EXTRACTION PAR L'EAU DISTILLÉE. — Nous avons suivi le principe de la technique de préparation de l'émulsine indiquée par HÉRISSEY [95], technique légèrement modifiée par DE SAINT STÉBAN [63].

Les amandes douces sont plongées deux minutes dans l'eau bouillante, mondées, broyées au hachoir universel, réduites en pâte au mortier et délayées dans deux parties d'eau toluénée à 5 p. 1000. Après 48 heures de macération à froid le lait d'Amande est passé à travers un linge, débarrassé du protéide phosphoré dénommé « caséine d'Amande » en ajoutant 10 cm³ d'acide acétique par kg. d'amandes. Le pH est ramené de 6,2 à 4,4 et le protéide floccule en entraînant l'huile. Le rendement final est en relation avec cette floculation, un protide rougissant à l'air et vraisemblablement riche en fonctions phé-

noliques précipite d'une façon variable selon les échantillons de matière première et s'ajoute en plus ou moins grande quantité au floculat caséique.

a) Le liquide opalescent obtenu après filtration sur papier mouillé a été traité de différentes façons.

1) *Dialyse* pendant 10 jours à 0° sur parchemin contre de l'eau distillée toluénée quotidiennement renouvelée (1). En ramenant le rendement à 1 kg. d'amandes (2) nous obtenons deux litres d'un liquide rosé contenant 41 g.,6 d'extract sec desséché à 100° et donnant 4 g.,992 de cendres par incinération dans une capsule en platine. Nous désignerons cette préparation dialysée sous le nom d'échantillon A₁.

2) *Précipitation alcoolique totale.* — Par addition de trois parties d'alcool à 90° maintenu à 0° il se précipite une pâte blanche, amorphe, recueillie sur un filtre après repos de 24 heures à la glacière ; le précipité est lavé successivement avec : de l'alcool à 95°, un mélange à volumes égaux d'alcool et d'éther, puis de l'éther. Par dessiccation dans le vide sulfurique on obtient une masse cornée jaunâtre, pulvérisée au mortier et desséchée à nouveau dans le vide sulfurique jusqu'à poids constant (3). Nous obtenons de 20 à 29 g. p. 1000 de l'échantillon A₂ qui est sensiblement identique à l'émulsine obtenue par la technique HÉRISSEY [95].

3) *Précipitation alcoolique fractionnée.* — Par addition d'une partie d'alcool à 90° l'échantillon A₃ est précipité (rendement 10 p. 1000), le filtrat est alors additionné de son volume d'alcool à 90° et l'échantillon A₄ précipite (rendement 1 p. 1000).

4) *Précipitation alcoolique en présence d'électrolytes.* — 100 g. de sulfate de sodium anhydre sont dissous dans

(1) Le protocole opératoire de dialyse est celui que nous avons toujours suivi pour les autres préparations fermentaires.

(2) Nos rendements seront toujours ramenés à un kg. d'Amande douce.

(3) Les précipités de substances fermentaires décrits dans la suite de ce chapitre seront recueillis, lavés et desséchés selon le même protocole opératoire.

un litre de liqueur fermentaire, la solution limpide est précipitée par trois volumes d'alcool à 90° ; nous recueillons 226 g. par kg. d'Amande d'une poudre amorphe, mise en suspension dans de l'eau bidistillée stérile, par agitation mécanique, passée sur coton et dialysée ; la liqueur dialysée est précipitée par trois parties d'alcool à 90° ce qui nous donne 6 g.,78 de préparation A₅ par kilog. d'Amande.

β) Le magma de caséine, précipité par acidification acétique, est délipidé par lavages successifs avec 400 cm³ d'alcool à 90°, d'alcool-éther et d'éther. Après dessiccation nous obtenons environ 100 g. d'échantillon B possédant une certaine activité phosphatasique. Cette poudre est partiellement soluble dans l'ammoniaque à 5 p. 100 en laissant un résidu privé d'activité diastasique ; la solution acidifiée par l'acide acétique laisse précipiter 13 à 14 g. de *caséine* purifiée sans aucune activité diastasique.

γ) Nous avons purifié l'émulsine A₂ ; cette dernière a été mise en suspension par agitation mécanique dans 20 parties d'eau distillée stérile ; la solution, filtrée sur coton, est précipitée par 4 parties d'acétone à 0° ; nous obtenons l'échantillon G, poudre blanche très légère, rendement 40 p. 100 à partir de la diastase A₂.

δ) Nous avons également mesuré l'activité d'une suspension aqueuse de poudre d'Amande délipidée à l'éther et desséchée dans le vide sulfurique : échantillon D.

b) EXTRACTION EN MILIEU ACIDE. — 1 kg. d'Amandes broyées sont mises à macérer 48 heures avec 2 l.,400 d'eau distillée contenant 100 g. de $\text{PO}_4\text{NaH}_2 + \text{H}_2\text{O}$; la phase liquide de pH 5,7 est séparée par filtration au papier ; nous l'avons traitée de deux façons différentes :

1) Une *dialyse* de trois jours fait apparaître un abondant précipité, éliminé par filtration ; une nouvelle dialyse de 17 jours donne 6 litres par kilog. d'Amande d'échantillon E₁, qui, traité par trois volumes d'alcool à 90°, fournit avec un rendement de 14 p. 1000 (Amande) l'échantillon E₂.

2) *Précipitation* par trois volumes d'alcool à 90° ; après 24 heures la floculation est plus ou moins complète ; on obtient de 80 à 140 g. de précipité, suspendu dans l'eau bidistillée par agitation mécanique, centrifugé ; le culot de centrifugation, lavé à plusieurs reprises, ne contient plus de phosphore minéral ; sa suspension dans l'eau distillée constitue l'échantillon E₄.

La phase liquide séparée par centrifugation donne par dialyse un liquide de pH 6,3 précipité par deux volumes d'acétone à 0°. Le rendement final est inversement proportionnel au poids du premier précipité 8 g.,90 p. 1000 pour l'échantillon E₃ α, 22 g.,40 p. 1000 E₃ β et E₃ γ.

c) EXTRACTION EN MILIEU ALCALIN. — Nous avons opéré en présence soit de PO₄Na₂H soit de NH₃ qui inactive sélectivement certaines des phosphatases et estérases co-existant dans la même préparation fermentaire, BAMANN et collaborateurs [14, 19, 20]. D'autre part l'ammoniaque facilite l'extraction d'une diastase des Amandes : la β glucosidase, WILLSTÄTTER et CSANYI [213].

1) *En présence de phosphate disodique.* — 1000 g. d'amandes broyées sont mises à macérer avec deux litres d'eau distillée et 200 g. de PO₄Na₂H + 12 H₂O. La phase liquide est acidifiée par 50 cm³ d'acide acétique, l'abondant précipité est séparé par essorage sur Buchner, le filtrat est précipité par trois parties d'alcool à 90° ; nous obtenons 66 g. d'un précipité granuleux difficile à dessécher, suspendu dans deux fois 600 cm³ d'eau, filtré sur papier ; le filtrat dialysé est précipité par deux volumes d'acétone à 0° et donne 9 g. d'échantillon F.

2) *Par l'ammoniaque diluée.* — A quelques modifications de détail près, nous avons suivi la technique de WILLSTÄTTER et CSANYI [213], 1000 g. de poudre d'Amande délipidée à l'éther et desséchée dans le vide sulfurique sont soumis à une agitation mécanique de 4 heures avec 5000 cm³ d'eau contenant 30 cm³ d'ammoniaque officinale ; la masse pâteuse est additionnée de 2 l.,500 d'eau renfermant 100 gouttes d'ammoniaque, agitée une

heure, essorée sur Buchner, le résidu est lavé avec deux fois 100 cm³ d'eau contenant 100 gouttes de NH₃. Le filtrat et les eaux de lavage sont acidifiés par 300 cm³ d'acide acétique normal, on recueille 108 g. de caséine G₁. Par addition de 30 p. 100 d'alcool à 90° il se dépose 50 g. de précipité G₂ ; le filtrat traité par 4 volumes d'alcool à 90° fournit 18 g. de l'échantillon G₃.

3) *Extraction par l'ammoniaque concentrée.* — Le protocole opératoire est identique mais les concentrations en ammoniaque sont différentes : extraction en utilisant 200 cm³ d'ammoniaque, lavages avec une solution à 4 p. 100, acidification par 150 cm³ d'acide acétique glacial qui précipite 70 g. de caséine H₁ totalement inactivée ; les 98 g. du premier précipité alcoolique H₂ sont également inactifs, par contre le second précipité H₃ est faiblement actif, deux essais ont donné 29 g., 50 de l'échantillon H₃ α ou 21 g. de H₃ β.

La liqueur, après acidification acétique à pH 5,6, est peu active et hydrolyse l'α glycérophosphate plus rapidement que le β, ce qui montre que l'extraction ammoniacale a modifié la spécificité de cette phosphatase comme l'étude des échantillons fermentaires l'a vérifié. Nous avons d'autre part dialysé directement le macéré ammoniacal ; la caséine précipite progressivement, nous filtrons et changeons de dialyseur le liquide H₄ qui, par action de 3 volumes d'alcool à 90°, donne 11 g., 10 de précipité H₅ (par kg. de poudre d'Amande dégraissée).

Enfin, l'émulsine HÉRISSEY A₂ conservée 5 jours dans un dessiccateur à vide contenant de l'ammoniaque donne une préparation presque totalement inactivée vis-à-vis des glycérophosphates, du pyrophosphate de sodium, du saccharose, très peu active sur le lactose, mais encore très active sur le salicoside.

d) *INFLUENCE DU VIEILLISSEMENT.* — Nous avons étudié l'activité de l'échantillon I, émulsine conservée depuis 28 ans au laboratoire de Chimie biologique de la Faculté de Pharmacie et de l'échantillon J âgé de treize ans qui,

au cours de sa préparation en juillet 1924, avait subi un léger début d'autolyse, caractérisé par une odeur butyrique.

B) Mesure de l'activité de ces diverses préparations fermentaires.

Les méthodes de mesure de l'activité des préparations fermentaires se divisent en deux principaux groupes :

1) Dans le premier groupe on établit le rapport entre la vitesse de réaction et le poids ou le volume de la préparation fermentaire, de façon à préciser l'activité par unité de poids ou volume. C'est une technique de ce type que nous avons adopté. Nous faisons réagir à 37° 50 cm³ de liquide contenant le substrat de pH 5,6 et la diastase. La vitesse initiale de la réaction nous a permis de calculer le rapport : constante des réactions monomoléculaires/grammes de préparation diastasique. Ce rapport K/g ne donne qu'une indication sur l'activité de la préparation ; le tableau XXXVIII montre qu'il varie avec le temps d'hydrolyse et la dose de préparation. Il est possible d'avoir une relation constante entre la vitesse de réaction et la dose de diastase si on utilise toujours la même dose de diastase totale (diastase active + diastase inactivée) ; comme nous désirions surtout comparer des préparations différentes il nous était pratiquement impossible d'utiliser un mélange de toutes les diastases inactivées. Afin d'augmenter la précision de nos résultats nous avons multiplié les expériences en faisant varier soit la durée d'hydrolyse, soit la concentration en diastase.

2) Dans le second groupe de techniques on oppose des doses constantes de préparation fermentaire à analyser et de substrat ; puis on détermine le temps nécessaire pour obtenir un certain pourcentage de décomposition du substrat (50 p. 100 en général). Nous avons

TABLEAU XXXVIII.

Activité phosphatasique des diverses préparations fermentaires d'Amande.

Préparation fermentaire		Substrat M/6 en cm ³	Durée d'hydrolyse en heures	mg. de P ₂ O ₅ libérés		K × 10 ⁵ g (1)	
Nature	Dose			α gl	β gl	α gl	β gl
Dialysat de l'extrait aqueux A ₁	0 g., 104 d'extrait sec	10	6	44	45	9,0	9,2
Emulsine HÉRISSEY A ₂	0 g., 02	20	3	16	17,5	14,1	15,5
			6	26,5	27,5	12,0	12,4
	0 g., 04		2	25	26,5	16,8	18,0
			4	38,75	36,5	13,5	12,6
	0 g., 10		3	53	50	10,2	9,5
			6	77,5	75	8,0	7,6
1 ^{er} fractionne- ment alcoolique A ₃	0 g., 20	20	3	76,5	76,5	7,8	7,8
			6	115	115	6,7	6,7
	0 g., 05		3	1,5	1,5	0,6	0,6
			6	3,5	3,5	0,6	0,6
	0 g., 10		3	3,5	4,0	0,6	0,7
			6	7,5	7,5	0,6	0,6
2 ^e fractionne- ment alcoolique A ₄	0 g., 20	20	4	15,0	16,5	0,9	1,1
			6	24,75	21,25	1,1	0,95
	0 g., 40		4	21,5	18,0	0,71	0,6
			8	32,5	30,0	0,55	0,51
Précipité en présence de SO ₄ Na ₂ A ₅	0 g., 05	20	4	16,6	9,0	4,4	2,3
			8	22,5	11,25	3,01	1,5
	0 g., 10		4	29,5		4,0	
			8	50,0		3,5	
Caséine d'amande en milieu neutre B	0 g., 02	10	6	24	25,5	22,8	24,4
	0 g., 50		3	15	18,75	0,52	0,66
			6	25	28,75	0,45	0,52
	1 g.		3	25	25	0,45	0,45
			6	40	43,75	0,37	0,41

(1) $K = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$ t en secondes, log vulgaires, x proportion de substrat de concentration initiale, a hydrolysé au bout du temps t.
g = grammes de préparation.

TABLEAU XXXVIII (suite).

Préparation fermentaire		Substrat M/6 en cm ³	Durée d'hydrolyse en heures	mg. de P ₂ O ₅ libérés		K × 10 ⁵ g	
Nature	Dose			α gl	β gl	α gl	β gl
Emulsine HÉRISSEY reprécipitée à l'acétone C	0 g., 01	20	3	12	12	21,2	21,2
			6	18,75	19,5	16,7	17,2
	0 g., 02		3	20,5	22	18,2	19,7
			6	33,75	33,75	15,5	15,5
	0 g., 05		3	43,3	45,0	16,3	17,0
			6	70,0	67,5	14,1	13,5
Poudre d'Aman- de délipidée D	0g., 10 + 0g., 10	20	6	16,5	17,5	1,45	1,55
	0 g., 20		6	25,5	26,0	1,14	1,17
Extrait phosphatique acide							
1) dialysé E ₁	5 cm ³	10	24	39,0	39,0		
2) précipité par l'alcool E ₂	0 g., 043	10	24	50,0	50,0	6,4	6,4
Emulsine en présence de PO ₄ Na H ₂	0 g., 03	20	48	27,5	14,75	1,03	0,54
E ₃ variété α	0 g., 05	20	24	20,5	14,25	0,91	0,63
variété β	0 g., 05	20	24 48	33 65	30 50	1,54 1,61	1,36 1,19
variété γ	0 g., 05	10	24	42,0	42,0	4,48	4,48
résidu insoluble E ₄	inconnue	15	24	13	12,5		
Emulsine en présence de PO ₄ Na ₂ H F	0 g., 025						
	+ 0 g., 025 inactivée	20	6	13,75	14,75	4,8	5,2
	0 g., 05	20	6	20,5	22,0	3,6	3,9
Caséine WILLSTÄTTER G ₁	0 g., 25	20	48	16	12	0,071	0,052
1 ^{er} précipité alcoolique G ₂	0 g., 20	20	24	11,25	10,0	0,12	0,11

TABLEAU XXXVIII (suite et fin).

Préparation fermentaire		Substrat M/6 en cm ³	Durée d'hydrolyse en heures	mg. de P ₂ O ₅ libérés		K × 10 ⁵ g	
Nature	Dose			α gl	β gl	α gl	β gl
Emulsine WILLSTÄTTER G ₃	0 g., 03	20	6	8,25	7,0	2,4	2,0
	+ 0 g., 02 inactivée	20	6	15,5	12,0	2,7	2,1
	0 g., 05	20	6	15,5	12,0	2,7	2,1
Emulsine en mi- lieu fortement ammoniacal H ₃ α	0 g., 05	20	216	52,0	24,0	0,28	0,12
	0 g., 10	20	24	12	7	0,26	0,15
			26	15	9	0,30	0,18
			48	27,5	13,5	0,31	0,15
H ₃ β	0 g., 05	20	24	23	11	1,02	0,48
			48	34,5	19,0	0,80	0,42
Dialysat ammoniacal H ₄	5 cm ³	10	24	1,8	1,5		
	10 cm ³	10	96	20,0	9,25		
Précipité du dialysat H ₅	0 g., 05	10	48	8,0	3,0	0,35	0,13
Emulsine 1909 I	0 g., 05	10	7	16	17	5,0	5,3
		20		21	19,5	3,2	3,0
		30		26	27,0	2,6	2,7
Emulsine 1924 J	0 g., 05	10	48	7,5	4,5	0,33	0,19
		30		9,5	7,0	0,13	0,1

comparé l'activité phosphatasique de nos préparations à leur activité β glucosidasique évaluée par une méthode de ce type. Nous avons utilisé la technique de HELFERICH [94] légèrement modifiée : 5 cm³ d'une suspension à 1 p. 100 de poudre fermentaire sont mis en contact un temps variable à 37° avec 20 cm³ d'une solution de salicoside à 2,5 p. 100 dans le mélange tampon de pH 4,6 contenant volumes égaux d'acide acétique et d'acétate de soude N/50. A la fin de la réaction la diastase est inactivée par 1 g. de CO₃K₂ et le liquide filtré examiné au polarimètre. Dans certains cas le saligénol

brunit et se précipite ; nous avons alors préféré déféquer avec une proportion aliquote d'une solution d'acétate neutre de Plomb.

Si on admet, avec HUDSON et PARDIE [103], que l'hydrolyse du salicoside est une réaction monomoléculaire, le temps t_z (*zeitwert*) permettant l'hydrolyse de 50 p. 100 du salicoside est donné par les équations suivantes :

$$(1) \quad K = \frac{1}{t_h} \log. \left[\frac{A}{A-x} \right]$$

$$(2) \quad t_z = \frac{\log. 2}{K} = \frac{t_h \cdot 0,301}{\log. A. - \log. (A-x)}$$

t_h est la durée d'hydrolyse en minutes, A est la somme des valeurs absolues des rotations dues au salicoside initial et au glucose libéré par son hydrolyse totale, x est en valeur absolue la variation du pouvoir rotatoire au temps t_z .

Dans le tableau XXXIX nous indiquons les valeurs de t_z obtenues avec diverses préparations.

C) Discussion des résultats expérimentaux.

Nous envisagerons ces résultats à différents points de vue : activité phosphatasique générale, action sur les esters phosphoriques et le salicoside et enfin action sur les deux glycérophosphates.

1) ACTIVITÉ PHOSPHATASIQUE GÉNÉRALE. — La phosphatase d'Amande est un lyoenzyme facilement extractible par l'eau distillée ; elle se comporte ainsi comme la plupart des autres phosphatases A_2 qui sont en général des lyoenzymes. Les préparations les plus actives sont celles obtenues par extraction à l'eau distillée : l'émulsine HÉRISSEY purifiée par reprécipitation acétonique donne une préparation très active. Le fractionnement par l'alcool, qui avait permis à GIRI [88] de séparer des fractions très actives de phosphatase de Soja, ne nous a pas donné les résultats escomptés, la diastase se trouvant partiellement inactivée. Par contre la précipi-

TABLEAU XXXIX.

Activité β glucosidasique des diverses préparations.

Préparation fermentaire	Durée de l'hydrolyse (en minutes)	Pouvoir rotatoire après hydrolyse (1)	t_z
Emulsine Hérisséey A ₂	15 20	— 1°10' — 0°42'	28 27
1 ^{er} fractionnement par l'alcool A ₃	10 20	— 1°10' — 0°21'	18,8 21,5
Caséine Hérisséey B	120 1020	— 1°40' + 0°25'	370 710
Emulsine Hérisséey purifiée C	10 15	— 0°40' — 0°5'	13,1 13,8
Suspension de poudre amandes délipidée D	20	— 2°10'	127
Emulsine en présence de PO ₄ NaH ₂ E ₃ α	10 20	— 1°5' — 0°40'	17,7 26,0
Emulsine en présence de PO ₄ Na ₂ H F	10 20	— 0°50' + 0°12'	14,7 15,7
1 ^{er} précipité par l'alcool Willstätter G ₂	20 300	— 2°16' + 0°20'	162 218
Emulsine Willstätter G ₃	5	— 1°15'	10
1 ^{er} précipité alcoolique en milieu fortement ammoniacal H ₂	360 1440	— 2°18' — 1°40'	3185 4400
Emulsine en milieu fortement ammoniacal H ₃ α	20 40	— 1°10' — 0°30'	37 47
Emulsine 1909 I	30	— 0°48'	43
Emulsine 1924 J	30 120	— 0,48' + 1°	43 60

(1) Pouvoir rotatoire avant hydrolyse, 1 = — 2°40'.

tation alcoolique en présence d'électrolytes nous a fourni la préparation A₅ la plus active. L'emploi des phosphates mono ou bi-métalliques ne semble pas favoriser l'extraction de la phosphatase. Il en est de même de l'ammoniaque diluée ; l'ammoniaque concentrée inactive considérablement la phosphatase.

2) ACTIVITÉ PHOSPHATASIQUE ET β GLUCOSIDASIQUE. — Il existe de nettes divergences entre ces deux activités ; le fait est particulièrement marquant avec les vieilles préparations d'émulsine I et J qui possèdent des activités identiques vis-à-vis du salicoside tandis que la préparation I contient une phosphatase environ 15 fois plus active que l'émulsine J. Les préparations obtenues en milieu alcalin présentent une activité phosphatasique faible ou moyenne ; ce sont par contre les plus actives vis-à-vis du salicoside ce qui confirme et étend les observations de WILLSTÄTTER et CSANYI [213]. Dans des recherches inédites effectuées en collaboration avec P. FLEURY nous avons mesuré l'activité pyrophosphatasique d'un certain nombre de ces échantillons diastasiques. D'une façon générale il existe un très net parallélisme entre les activités glycérophosphatasique et pyrophosphatasique ; la pyrophosphatase apparaît être la plus fragile des deux diastases et les préparations où la glycérophosphatase a été partiellement inactivée sont peu actives (A₄) ou totalement inactives (H₃ α et β H₄, H₅) sur les pyrophosphates.

3) ACTION SUR LES α ET β GLYCÉROPHOSPHATES. — Toutes les préparations de moyenne et forte activité dédoublent les deux isomères à des vitesses sensiblement égales (dans certains cas le β glycérophosphate paraît être dédoublé un peu plus rapidement).

Les préparations peu actives où la diastase a été partiellement détruite hydrolysent l' α glycérophosphate plus rapidement que son isomère : échantillons A₃ et A₄ obtenus par fractionnement alcoolique, émulsine E₃ α obtenue par floculation en présence d'alcool et de phos-

phates acides et enfin toutes les préparations obtenues en milieu ammoniacal. Les poudres fermentaires obtenues en milieu fortement ammoniacal (G_1 , G_2 , G_3) dédoublent l' α glycérophosphate un peu plus rapidement que le β ; cet écart est beaucoup plus accentué avec les préparations obtenues en milieu fortement ammoniacal (H_3 α et β , H_4 , H_5). Enfin l'émulsine J qui avait subi un début d'autolyse dédouble également l' α plus rapidement que le β . Nous avons étudié plus spécialement les phosphatases H_3 et J en vue de rechercher la nature de cette modification de spécificité. Plusieurs hypothèses permettaient d'interpréter cette modification :

a) Libération d'un inhibiteur de l'hydrolyse du β glycérophosphate (ou élimination d'un activateur).

b) Existence d'une seconde phosphatase, coexistante, (*isodyname*), peu active, masquée dans les préparations normales par une autre phosphatase plus active qui aurait disparu des préparations partiellement inactivées.

c) Modification des affinités et vitesses d'hydrolyse maxima vis-à-vis des deux isomères par inactivation partielle.

Trois séries d'expériences ont été réalisées pour connaître la valeur de ces hypothèses.

a) *Action de la phosphatase obtenue en milieu ammoniacal H_3 α sur l'émulsine A_2 .* — En 2 heures à $+ 37^\circ$ 0 g.,05 d'émulsine HÉRISSEY réagissant sur 20 cm³ de substrat M/6 à pH 5,6, en présence de 30 cm³ d'eau libèrent 27 mg. de P_2O_5 à partir de l' α glycérophosphate et 27,5 à partir du β ; en ajoutant en sus 0 g.,05 de diastase active H_3 α nous obtenons respectivement 25 et 26 mg. D'autre part l'émulsine A_2 inactivée par ébullition inhibe de façon semblable l'hydrolyse des α et β glycérophosphates par la diastase H_3 α . Il n'y a donc ni élimination d'activateur, ni libération d'inhibiteur de l'hydrolyse du β glycérophosphate.

TABEAU XL.

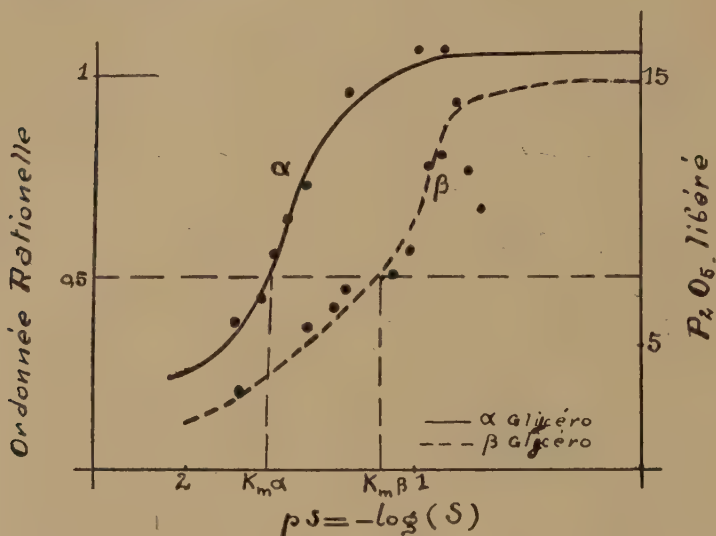
pH optimum des phosphatases partiellement inactivées.

Diastrase H₃ α 0 g., 05 ou diastrase J 0 g., 10, substrat $\frac{M}{6}$ 20 cm³, acide citrique q. s. volume 50 cm³.

Les chiffres indiquent le nombre de mg. de P₂O₅ libérés en 24 heures (diastrase H₃ α)
ou 48 heures (diastrase J).

pH	3,8	4,0	4,2	4,4	4,5	4,7	4,8	4,9	5,0	5,3	5,4	5,7	5,8	6,0	6,2	6,7
Diastrase. α gl	0,5		8		10			10,5			13,5	13		11		9
H ₃ α..... β gl	traces		3		5			6,0			6,5	6		5,5		5
Diastrase. α gl	6	13	15	17	16,5	16	16,5	17	16	16,5	17,5	16		16	16,5	10
J..... β gl	3	6,5	7,5	8			11,0			12,0		12,5	13		9	5

b) *Activité en fonction du pH.* — Nous avons indiqué nos résultats dans le tableau XL. Le pH optimum de la phosphatase inactivée par NH_3 se place vers 5,4 pour les deux isomères. Avec la diastase J le pH optimum du β se trouve aux alentours de 5,6-5,8 ; l'optimum de l' α est extrêmement peu saillant et de pH 4,4 à 6,2, la vitesse de réaction n'est sensiblement pas modifiée par le pH. Enfin les deux diastases hydrolysent toujours l' α plus rapidement.



COURBE 8. — Action de la phosphatase d'Amande partiellement inactivée par l'ammoniaque sur des doses croissantes de glycérophosphates. (S) = concentration moléculaire du substrat.

D'une façon générale le pH optimum n'a pas été déplacé par l'inactivation partielle et il paraît douteux que nous soyons en présence d'un second type de phosphatase A_2 normalement préexistant dans les Amandes.

c) *Mesure de l'affinité de ces phosphatases.* — Les chiffres du tableau XLI nous permettent de calculer que l'affinité de la phosphatase H_3 est $K_M = 35$ pour l' α

et $K_M = 20$ pour le β , contre $K_M \alpha = 100$ et $K_M \beta = 40$ avec la diastase J. Les deux diastases présentent donc une plus grande affinité pour l' α glycérophosphate que pour le β ; par contre les vitesses optima d'hydrolyse des deux formes sont presque identiques (la courbe ci-jointe traduit nettement ces faits). Les deux échantillons se comportent donc comme des phosphatases à plus grande affinité pour l' α , mais à vitesses maxima d'hydrolyse identiques. Tout se passe donc comme si l'inactivation partielle avait modifié le support colloïdal en faisant varier inégalement son affinité vis-à-vis des deux isomères, les groupes actifs saturés de substrat conservant leurs capacités réactionnelles égales vis-à-vis des deux isomères.

D'autres exemples de modification du support colloïdal sont connus. WILLSTÄTTER et SCHNEIDER [219] ont montré que la sucrase de levure était associée à un polypeptide à tryptophane au début de l'autolyse et à un polypeptide riche en tyrosine mais privé de tryptophane pour une autolyse de longue durée.

Les opérations brutales ayant provoqué l'inactivation partielle (action de NH_3 , autolyse) semblent donc avoir modifié la spécificité du support colloïdal de la même glycérophosphatase qui réagit ainsi différemment vis-à-vis des deux glycérophosphates. Ces modifications peuvent donc être interprétées sans avoir recours à l'hypothèse de l'existence d' α et β glycérophosphatases distinctes.

II. — PRÉPARATIONS FERMENTAIRES OBTENUES EN UTILISANT LES TECHNIQUES D'ADSORPTION.

Nous avons étudié l'adsorption à différents pH sur trois adsorbants différents ; nous avons ensuite préparé des échantillons diastasiques purifiés par adsorption puis élution par les substrats spécifiques (glycérophosphates).

A) *Essais d'adsorption à différents pH.*

Technique opératoire. — Comme adsorbants nous avons utilisé l'alumine C γ de WILLSTÄTTER et KRAUT, le kaolin « tonsil » et le charbon animal lavé pour analyse Rhône Poulenc.

Nous sommes partis d'une macération d'amandes partiellement déprotéinisée et dialysée (échantillon A₁). Nous avons également employé 0 g.,20 soit d'émulsine HÉRISSEY reprecipitée par l'acétone C, soit de l'extrait en présence de PO₄ Na H₂, dialysé E₁. 20 cm³ de préparation diastasique, 10 cm³ du tampon acide citrique-soude et 10 cm³ de suspension de l'adsorbant sont soumis à une agitation mécanique de 20 minutes. Après centrifugation 10 cm³ de liquide surnageant amené à pH 5,6 sont mis en contact 6 heures à 37° avec : 10 cm³ de substrat M/6 de pH 5,6, 10 cm³ de tampon acide citrique-soude de pH 5,6 et de l'eau q. s. 50 cm³. Nous avons opéré simultanément avec un témoin où l'adsorbant est remplacé par 10 cm³ d'eau distillée. Le pourcentage d'adsorption est représenté par le rapport $\left[\frac{K-K'}{K} \right] \cdot 10^2$ où K est la constante des réactions monomoléculaires du témoin et K' celle de la préparation après adsorption.

Discussion des résultats. — 1) Après adsorption le liquide surnageant agit d'une façon identique sur les deux isomères, ceci quelles que soient les variables (pH, adsorbant, diastase). Tout se passe là encore comme s'il n'y avait qu'une seule glycérophosphatase.

2) Avec les trois adsorbants le pourcentage d'adsorption augmente avec l'acidité. BAUER [25] a observé des faits analogues avec l' α glycérophosphatase de levure et l'alumine C γ .

3) L'alumine C γ est le plus actif des trois adsorbants.

TABLEAU XXXXII.
Adsorption de la phosphatase d'Amande dans diverses conditions.

Préparation fermentaire	Adsorbant	pH d'adsorption	mg. de P ₂ O ₅ hydrolysés				K × 10 ⁷		K' × 10 ⁷		$\left \frac{K-K'}{K} \right 10^{-2}$	
			témoin		après adsorption		α gl	β gl	α gl	β gl	α gl	β gl
			α gl	β gl	α gl	β gl						
Macération d'amandes privée de caséine et dialysée	Alumine C γ (donnant après calcination 0 g, 11 d'Al ₂ O ₃ pour 10 cm ³ de suspension)	3,6	33	33	6	8	65,7	65,7	10,5	14,0	84	79
		4,5	27	27	8	8	52,0	52,0	14,0	14,0	73	73
		5,6	33	32	8,75	8,5	65,7	63,4	15,5	15,0	77	76
		6,4	32	32	18	19,5	63,4	63,4	33,2	36,2	47	43
		8,6	32	32	22,5	22,5	63,4	63,4	42,4	42,4	33	33
Emulsine Hérissey purifiée C	id.	5,6	28	28,5	12,5	13,5	54,2	55,3	22,5	24,4	58	56
		3,6	28	29	6,5	6,75	54,2	56,5	11,4	11,8	79	79
		5,6	31	31	12	13	61	61	21,5	23,4	65	61
Emulsine en présence de PO ₄ NaH ₂ et dialysée	id.	7,4	31	31	27	28	61	61	52	54,2	44	41
		3,6	9,0	9,5	1	1	16	16,8	1,75	1,75	88	89
		5,6	29	30	13,5	14	56,5	58,7	24,4	25,3	57	57
Macération d'amandes privée de caséine et dial	1 g. de charbon animal	5,6	28	29	22	22	54,2	56,5	44,3	41,3	24	27

B) *Essais d'élution spécifique.*

Technique opératoire. — 100 cm³ de liquide diastatique (échantillon type A₁) sont agités mécaniquement pendant 20 minutes avec 10 cm³ du tampon acide citrique-NaOH de pH 5,6 et 40 cm³ de suspension d'alumine C γ (correspondant à 0 g.,44 d'Al₂O₃ calcinée). Après centrifugation nous mesurons dans les conditions habituelles le pourcentage d'adsorption qui est de 79 vis-à-vis de l' α et 76 vis-à-vis du β . Le culot, suspendu dans 100 cm³ d'eau à 0°, fournit une suspension dont l'activité est sensiblement égale à celle de la proportion de diastase adsorbée ; celle-ci conserve donc son activité. Cette suspension est soumise à une agitation mécanique d'une heure avec 2 g. de β glycérophosphate disodique puis centrifugée ; le culot de centrifugation retient 12,5 p. 100 de l'activité de la suspension vis-à-vis de l' α et 11,5 vis-à-vis du β . Près de 90 p. 100 de la diastase a donc été éluee ; ceci confirme que la phosphatase d'Amande est une lyophosphatase à élution aisée, ce qui la différencie d'autres phosphatases (page 16).

Le liquide surnageant obtenu par centrifugation est dialysé ; cette dialyse inactive partiellement la diastase ; ce fait a été déjà signalé avec d'autres phosphatases (page 16). Nous obtenons finalement une préparation conservant 52 p. 100 (α) et 51 p. 100 (β) de l'activité initiale de la macération A₁.

En substituant 2 g. d' α glycérophosphate disodique à son isomère nous avons également élué une préparation très active ; par contre l'emploi de 2 g. de pyrophosphate tétrasodique a fourni une préparation inactive non seulement sur ce substrat mais encore sur les glycérophosphates ; cette préparation pratiquement privée de phosphatases possède une nette activité hydrolysante vis-à-vis du salicoside. Signalons à ce sujet que l'élution par les glycérophosphates fournit des préparations riches en pyrophosphatase.

Les liqueurs obtenues par élution renferment des traces d'alumine peptisée qui les rendent opalescentes ; elles donnent faiblement les réactions des protéïdes : opalescence avec l'acétate neutre de plomb, les acides picrique et trichloracétique, léger précipité par les acides phospho-tungstique et molybdique et le réactif nitro-mercurique, mais réaction de Millon négative. Ces préparations sont assez stables : l'éluat par le β glycérophosphate conservé 4 mois à 0° possède encore 30 p. 100 de l'activité initiale, l'éluat par l' α en possède 35 p. 100. Ces deux préparations ainsi conservées hydrolysent les deux glycérophosphates à des vitesses égales.

Nous avons déterminé le rapport K/g des préparations purifiées en les faisant réagir 6 heures à 37° sur 10 cm³ de substrat M/6 de pH 5,6 et de l'eau q. s. 50 cm³ (tableau XLIII).

TABLEAU XXXXIII.

Activité des préparations obtenues par adsorption et élution.

Préparation diastasique	Volume de préparation (en cm ³)	Extrait sec à 100° (pour la prise d'essai)	Cendres p. 100 de l'extrait sec	Mg. de P ₂ O ₅ libérés		K $\times$ 10 ⁵ g extrait sec	
				α gl	β gl	α gl	β gl
Macération d'amandes initiale	5	0 g.,104	12	44	45	9	9,2
Elution par le β glycérophosphate	5	0 g.,00483	72	19	19	72,8	72,8
	10	0 g.,00966	72	28	30	56	60,7
Elution par l' α glycérophosphate	3	0 g.,0032	32,5	9,5	10	52,4	55,3
	5	0 g.,0053	32,5	13	14	43,6	47,2

Discussion des résultats. — 1) Les diverses fractions à activité phosphatasique variable dédoublent les deux glycérophosphates à des vitesses sensiblement identiques ; il n'y a donc ni adsorption, ni élution, ni inactivation spécifique d'une α ou β glycérophosphatase éventuelle. Nous devons cependant faire remarquer que les préparations purifiées sont très actives sur le pyrophosphate de sodium et le salicoside.

2) Les échantillons diastasiques obtenus par élution présentent des rapports K/g plus élevés que ceux de toutes les autres préparations antérieurement étudiées, la teneur relativement élevée en alumine diminue la valeur de ce rapport qui est beaucoup plus élevé en réalité.

TABEAU XXXXIV.

15 cm³ de liqueur fermentaire réagissent sur 10 cm³
de substrat $\frac{M}{6}$ en présence d'eau et d'acide citrique.
(Volume total 50 cm³ — 8 h. 30' à + 37°).

pH		4,1	4,9	5,3	5,4	5,7	5,8	6,0	6,4
mg. de P ₂ O ₅ libérés	α gl.	4,5	8,5	»	9,5	»	8	7,5	5,5
	β gl.	4,5	8,5	9	»	10	»	7,5	6

Nous avons déterminé le pH optimum (tableau XLIV) et l'affinité (tableau XLV) d'une préparation éluee par le β glycérophosphate.

a) Le pH optimum est aux environs de 5,4-5,7 comme pour l'émulsine HÉRISSEY ; il est le même pour les deux glycérophosphates hydrolysés à des vitesses égales quel que soit le pH.

b) Les deux isomères sont également hydrolysés à des vitesses égales quelle que soit la concentration du substrat ; il en résulte que les vitesses maxima et affi-

nités sont identiques. L'affinité $K_M = 100$ est plus élevée que pour l'émulsine HÉRISSEY ($K_M = 47,5$) ; la purification augmente l'affinité peut-être en éliminant un inhibiteur concurrent. La phosphatase se comporte différemment de la sucrase de levure dont l'affinité est indépendante de la pureté de la préparation, KUHN [138].

TABEAU XXXV.

pH 5,6 — 8 h 15' à 37° — volume 50 cm³
10 cm³ de liqueur diastasique.

Concentration moléculaire du substrat		0,0066	0,01	0,0133	0,016	0,033	0,066	0,1	0,116	0,133
mg. de P ₂ O ₅ libérés	α gl.	»	4,5	»	5,5	7	7,25	8,75	»	»
	β gl.	3,75	4,5	5,0	5,5	7	7,25	8,5	8,75	8,75

C) *Recherches en vue d'améliorer la purification.*

En suivant la technique opératoire précédemment décrite nous avons préparé une solution de phosphatase adsorbée sur alumine et éluée par le sel β. 100 cm³ de cette préparation ont été soumis à une nouvelle adsorption par agitation de 30 minutes avec 10 cm³ de tampon de pH 5,6 et 40 cm³ de suspension d'alumine C γ. Le pourcentage d'adsorption est de 47 (α et β). Après centrifugation le culot est suspendu dans 100 cm³ de β glycérophosphate disodique à 1 p. 100 à 0° ; le liquide surnageant obtenu par centrifugation est dialysé. Cette nouvelle dialyse inactive fortement la phosphatase et donne une préparation demeurant limpide avec les acides trichloracétique et phosphotungstique, fournissant une légère opalescence avec les acides picrique, phosphomolybdique et le réactif nitro-mercurique. 120 cm³ de cette préparation donnent 0 g.,05 d'extrait sec

renfermant 46 p. 100 de cendres riches en alumine et contenant moins de 54 γ de Mg dosé par la technique de JAVILLIER et LAVOLLAY [116] appliquée aux cendres riches en Al.

Nous avons cherché à réactiver cette préparation par :

- 1) une solution de nitrate de Mg
- 2) un extrait aqueux bouilli de poudre d'Amande dont 20 cm³ contenaient Mg = 1 mg.,24 et
- 3) une suspension de cendres de poudre d'Amande contenant P₂O₅ = 7 mg.,5, Ca = 4 mg.,4, Mg = 5 mg.,4 dans 20 cm³.

Nous avons fait réagir la préparation fermentaire sur 10 cm³ de substrat M/6 de pH 5,6 à 37° (volume total 50 cm³) (tableau XLVI).

La liqueur diastasique obtenue après deux adsorptions et éluutions successives est donc nettement réactivée par l'extrait aqueux de poudre d'Amande et surtout par les cendres d'Amande ; cette réactivation est particulièrement nette car les cendres riches en phosphates devaient *a priori* exercer une certaine action inhibitrice. Le magnésium de ces préparations n'est pas l'agent actif car le nitrate de magnésium est pratiquement sans action sur cette phosphatase ; il s'agit donc vraisemblablement d'autres substances minérales éliminées au cours des opérations d'adsorption, élution et dialyse, car la macération d'amandes utilisée comme matière première n'est pas activée par les cendres ou l'extrait aqueux de poudre d'Amande. Nous pouvons en outre remarquer que cette phosphatase, brute ou réactivée, hydrolyse les deux glycérophosphates à des vitesses sensiblement identiques.

III. — PURIFICATION PAR PRÉADSORPTION.

Nous avons signalé (p. 16) que BAMANN et SALZER [19] avaient éliminé par le phosphate de plomb naissant la majeure partie des substances inactives d'une préparation diastasique d'origine hépatique ; nous avons suivi

TABLEAU XXXXVI.

Action de diverses substances sur la phosphatase avant et après adsorptions et éluions.

Préparation diastasique (en cm ³)	Durée de l'hydrolyse (en heures)	Mg. de l'O ₂ libérés											
		témoiu		Mg. 1,94 mg (en (NO ₃) ² Mg.)		suspension de cendres d'Amande				extrait aqueux de poudre d'Amande			
						10 cm ³		20 cm ³		10 cm ³		20 cm ³	
		α	β	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β
Macérations d'amandes dialysée A ₁	5	17	17	16	16,5	16	18			17	17		
	10	23	22	20	22	25	25			24	23		
Double adsorption et élution	20	4,5	5	5	5			9,5	9,5			7,5	7,5
	30	9	8,5	10	9,5	12,5	12			13	13		

leur technique : 50 cm³ de macération d'amandes partiellement déprotéinisée (type échantillon A₁) sont additionnés de 0 cm³,2 de phosphate diammonique à 10 p. 100 puis, en agitant vigoureusement, de 0 cm³,6 d'une solution à 10 p. 100 d'acétate neutre de Pb dans l'acide acétique N/10. Après de nouvelles agitations nous ajoutons quelques cg. de terre d'infusoires et centrifugeons ; un abondant précipité violacé se collecte aisément, le phosphate en excès du liquide surnageant est éliminé par dialyse. La solution obtenue est limpide, fournit très nettement les réactions de précipitation des protides, ce qui la différencie de la préparation d'origine hépatique qui ne donne que très faiblement ces réactions, BAMANN et SALZER [19] ; 100 cm³ de notre solution renferment 1 g.,027 d'extrait sec à 100°.

Nous avons déterminé le pH optimum de cette solution en mettant en contact 22 heures à 37° 4 cm³ de préparation diastasique, 20 cm³ de substrat M/6, de l'acide citrique et de l'eau q. s. 50 cm³ (tableau IIIL).

TABLEAU XXXXVII.

Activité en fonction du pH de la phosphatase d'Amande purifiée par préadsorption.

pH		3,5	3,7	4,1	4,2	4,8	5,2	5,5	5,65	6,0	6,2	6,6
P ₂ O ₃ libéré (en mg.)	α	»	21	»	35	41	39	44	42	39	33	26
	β	16	»	31	»	42	41	40	43	39	31	28

Le pH optimum se place vers 5,5-5,6, il est peu sailant ; BAMANN et SALZER ont observé le même fait avec la phosphatase hépatique ainsi purifiée ; le pH optimum reste donc le même que celui de la phosphatase d'Amande brute et les deux isomères sont également dédoublés à des vitesses égales quel que soit le pH, ce qui concorde

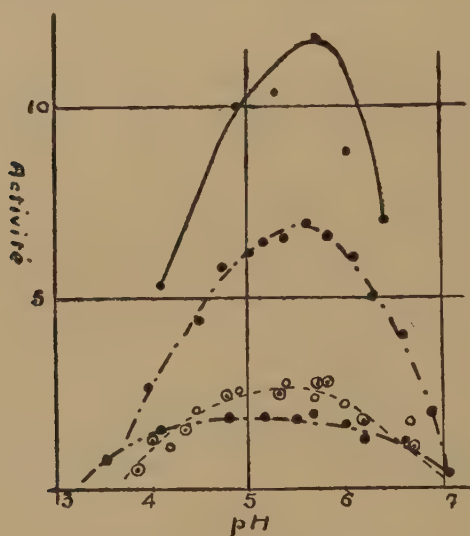
avec l'existence d'une seule glycérophosphatase non spécifique.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE III.

La phosphatase d'Amande est une lyophosphatase facilement extractible par l'eau ; les extraits aqueux donnent des préparations très actives : soit par précipitation alcoolique ou acétonique, soit encore par adsorption sur alumine et élution par les α ou β glycérophosphates. L'extraction en présence de phosphates mono- ou di-sodiques n'améliore pas le rendement, l'ammoniaque inactive partiellement cette phosphatase ; il en est de même par une dialyse très poussée. La phosphatase purifiée par adsorption et élution est presque totalement privée de protides ; elle est activée par des substances minérales différentes du magnésium qui préexistent dans les Amandes. Il n'a pas été possible de différencier une α et une β glycérophosphatase ; toutes les préparations de moyenne et forte activité hydrolysent les deux glycérophosphatases à des vitesses sensiblement égales, ceci quelles que soient les techniques de purification : extraction, fractionnement, dialyse, précipitation, adsorption et préadsorption, élution par l'un ou l'autre des glycérophosphates.

Les préparations partiellement inactivées par autolyse ou action de l'ammoniaque subissent une altération de leur support colloïdal qui se manifeste par une plus grande affinité vis-à-vis de l' α glycérophosphate, cependant les deux isomères demeurent hydrolysés à des vitesses égales lorsque la diastase est saturée de substrat. Il ne semble exister qu'une seule phosphatase du type A_2 dans les Amandes ; les préparations purifiées par adsorption, élution, préadsorption, ou inactivées partiellement présentent toujours une réactivité maxima vers pH 5,6-5,8. Le graphique ci-joint représente les courbes d'hydrolyse du β glycérophosphate en fonction du pH

par divers échantillons de phosphatase d'Amande, ces échantillons de pureté variable permettent de tracer des courbes similaires.



COURBE 9. — *Activité en fonction du pH de divers échantillons de phosphatase d'Amande.*

- phosphatase purifiée par adsorption.
- - - - - phosphatase partiellement inactivée par l'ammoniaque.
- - - - - phosphatase partiellement inactivée par autolyse.
- . - . - phosphatase après préadsorption.
- - - - - émulsine en présence de divers tampons.

S'il existe un net parallélisme entre les activités glycérophosphatasique et pyrophosphatasique des divers échantillons, nous avons par contre observé de très nettes dissemblances entre les activités phosphatasique et β glucosidasique ; les préparations obtenues par extraction en milieu alcalin sont les plus actives sur le salicose.

QUATRIÈME PARTIE.

Recherches sur la synthèse biochimique des glycérophosphates.

Dans le chapitre préliminaire sur les phosphatases nous avons signalé que la phosphomonoestérase A_1 pouvait provoquer la synthèse des glycérophosphates. Les corps ainsi obtenus sont constitués soit par un mélange sensiblement équimoléculaire des deux isomères (takadiastase) soit par un mélange contenant au moins 85 p. 100 d' α glycérophosphate, caractérisé par son hydrolyse biochimique (phosphatase duodénale).

Nous nous sommes proposé, en premier lieu, de comparer l'action synthétisante d'une phosphatase animale A_1 (rein) à celle d'une végétale A_2 (Amande) et, en second lieu, de comparer l'analyse chimique des glycérophosphates obtenus par biosynthèse à l'étude de leur hydrolyse réalisée en faisant réagir sur ces corps les phosphatases à réactivités différentes étudiées dans ce travail. L'isolement des glycérophosphates à partir des produits de la réaction biosynthétique a soulevé quelques difficultés ; nous envisagerons donc en trois chapitres distincts : la technique d'isolement des esters synthétisés, l'action synthétisante de la phosphatase rénale et enfin celle de la phosphatase d'Amande.

CHAPITRE I.

ISOLEMENT DES GLYCÉROPHOSPHATES A PARTIR DU MÉLANGE RÉACTIONNEL.

En utilisant les mêmes proportions de réactifs que KAY [124], au terme de la réaction biosynthétisante ces réactifs se trouvent sensiblement dans les proportions suivantes : glycérophosphate disodique 8 à 10 g., glycérrol 160 cm³, préparation fermentaire 100 cm³.

Nous distinguons trois stades dans le fractionnement de ce mélange :

- 1) Elimination du phosphore minéral ;
- 2) Précipitation du phosphore organique ;
- 3) Purification du précipité d'esters phosphoriques.

1) ELIMINATION DU PHOSPHORE MINÉRAL.

Nous avons comparé les éliminations par divers métaux : calcium, magnésium, plomb et uranium.

a) *Par la chaux.* — KAY [124] inactive la diastase (phosphatase duodénale) par chauffage à 100°, dilue la solution glycérolée de son volume d'eau contenant du nitrate de calcium, et ajoute de l'ammoniaque jusqu'à ce qu'il ne se forme plus de précipité. Nous avons répété cette opération avec les phosphatases du rein et d'Amande ; il se forme un abondant précipité crémeux se déposant lentement ; ce précipité contient la presque totalité du phosphore minéral, adsorbe les protéines de la préparation fermentaire mais fixe également une forte proportion du phosphore organique comme FLEURY et SUTU [80] l'ont signalé. Avec 3 g. de glycérophosphate et les proportions de réactifs indiquées plus haut près

de la moitié du phosphore organique est fixé par le précipité de phosphate tricalcique (58 p. 100 avec le β glycérophosphate, 48 p. 100 avec l' α et 44 p. 100 avec un mélange à parties égales des deux isomères).

Cette perte de phosphore organique est le principal défaut de la technique d'isolement de KAY dont les stades ultérieurs donnent d'excellents rendements. Afin de réduire cette perte, le précipité de phosphate tricalcique, essoré sur un Buchner, est traité par 300 cm³ d'acide nitrique à 3,5 p. 100, une partie des protéines dénaturées reste sur le filtre ; le filtrat est alors neutralisé au carbonate de chaux puis alcalinisé légèrement à l'ammoniaque ; une partie du phosphore organique du premier précipité échappe ainsi à l'adsorption sur le second précipité.

b) *Par la magnésie.* — FLEURY et SUTU [80] ont montré que la précipitation de l'acide phosphorique sous forme de sel ammoniaco-magnésien cristallisé n'entraînait que des traces de phosphore organique. Nous avons confirmé ces résultats en utilisant un protocole opératoire différent : la solution glycérolée est diluée d'un volume égal d'une solution faiblement nitrique contenant les nitrates de magnésium et ammonium ; nous ajoutons de l'ammoniaque diluée goutte à goutte en agitant continuellement jusqu'à virage de la phaléine. Après 24 heures de repos il s'est déposé un abondant précipité cristallin contenant la totalité de P minéral et ne retenant que 12 à 15 p. 100 de P organique quel que soit le glycérophosphate.

c) *Par le plomb.* — La solution glycérolée est versée en agitant dans une solution d'acétate neutre de plomb ; après 48 heures la presque totalité de P minéral et organique est précipitée. Nous avons eu recours à cette technique pour séparer d'emblée le phosphore total du liquide glycérolé.

d) *Par l'urane.* — Le précipité amorphe de phosphate d'urane retient la presque totalité du phosphore organique ce qui rend la technique inutilisable.

2) PRÉCIPITATION DU PHOSPHORE ORGANIQUE.

Nous avons comparé les résultats obtenus en utilisant différents sels métalliques : mercureux, barytique et plombique.

a) *Sels mercuraux.* — PRUNIER [176] a montré que les glycérophosphates mercuraux sont peu solubles, IONESCU-MATIU et POPESCO [108] ont utilisé cette propriété pour doser les glycérophosphates en déterminant l'ion Hg précipité par leur méthode mercurimétrique. Nos essais ont été infructueux ; il n'a pas été possible de précipiter par le nitrate mercuraux la majeure partie des glycérophosphates présents dans la solution glycérolée privée de phosphates et débarrassée de l'ammoniaque en excès par concentration au bain-marie. Nos échecs peuvent être rapportés à deux faits distincts :

1° il est très difficile d'obtenir un précipité blanc de glycérophosphate mercuraux non souillé de sels basiques.

2° la solubilité des glycérophosphates mercuraux n'est pas négligeable : 0 g.,30 p. 1000 à 15°-20° pour le β et 0 g.,80 p. 1000 pour l' α d'après nos propres déterminations.

b) *Sels de baryum.* — Cette technique n'a pas donné les résultats escomptés, en milieu glycérolé et en présence de sels ammoniacaux, les glycérophosphates de baryum moins solubles à chaud qu'à froid ne sont que peu ou pas précipités par chauffage.

c) *Sels de plomb.* — C'est la technique utilisée par KAY ; la solution glycérolée débarrassée des phosphates et de l'ammoniaque libre, est traitée par un excès d'acétate neutre de plomb ; après 48 heures 95 p. 100 du phosphore organique restant est précipité, comme nous l'avons vérifié. Nous avons recherché si le glycérophosphate de plomb comme d'autres glycérophosphates métalliques était moins soluble à chaud ; en portant à 100° la solution glycérolée débarrassée du premier précipité

plombique il se forme un nouveau précipité retenant 2 à 3 p. 100 du phosphore organique persistant après défécation calcique.

La précipitation plombique après élimination des phosphates par la chaux donne donc d'excellents résultats ; il n'en est malheureusement pas de même après élimination des phosphates par la mixture magnésienne ; les sels de magnésium et d'ammonium en excès entravent fortement la précipitation du glycérophosphate de plomb. Les glycérophosphates sont très stables en milieu alcalin ; nous avons essayé d'éliminer l'ammoniaque et la magnésie par chauffage en milieu sodique ; nous avons rencontré deux causes d'échec :

1) La solution retient énergiquement l'ammoniaque très difficile à éliminer même sous pression réduite ou dans le vide sulfurique.

2) La magnésie précipitée en milieu alcalin adsorbe aisément les glycérophosphates qui sont fixés vraisemblablement par leurs fonctions hydroxylées comme le sont dans les mêmes conditions les polyols. J. COURTOIS [53], Mlle JOLY [118].

TECHNIQUES UTILISÉES. — Au cours de nos recherches nous avons utilisé soit la technique de KAY avec les modifications de détail que nous avons apportées soit la technique suivante où nous nous sommes efforcés de précipiter les glycérophosphates dans des solutions pauvres en glycérol et sels minéraux.

Le phosphore total est précipité par le plomb, libéré de ce précipité par SH_2 en milieu aqueux ; le filtrat, débarrassé de l'excès de SH_2 par chauffage, est additionné de nitrate de magnésium ($1/10^e$ en sus de la quantité théoriquement nécessaire pour précipiter les orthophosphates préalablement dosés), puis d'ammoniaque jusqu'à neutralité à la phtaléine. Après 24 heures le phosphate ammoniaco-magnésien est éliminé par filtration ; le filtrat concentré au bain-marie est alors traité par un excès d'acétate de plomb.

3) PURIFICATION DU PRÉCIPITÉ D'ESTERS PHOSPHORIQUES.

Nous suivons grossièrement la technique de KAY. Le précipité plombique est lavé à l'alcool pour le débarrasser d'une partie du glycérol fixé, délayé dans de l'eau froide puis traité par SH_2 . Après filtration et lavage du sulfure plombique, les liqueurs aqueuses sont débarrassées de l'excès de SH_2 par ébullition, refroidies et neutralisées à la phtaléine par la baryte ; il se dépose en général un léger précipité de phosphate de baryum éliminé par filtration. Le filtrat est concentré au bain-marie jusqu'à début de précipitation des glycérophosphates de baryum, presque intégralement insolubilisés par addition de deux volumes d'alcool à 90° bouillant. Après 24 heures de repos le précipité barytique est recueilli, lavé à l'alcool à 95° pour le débarrasser du glycérol résiduel, qu'il fixe assez aisément. Ce sel est purifié par redissolution dans le minimum d'eau froide et reprécipitation alcoolique ; le corps obtenu est débarrassé des dernières traces de glycérol en l'épuisant au Soxhlet par l'alcool absolu.

En partant de mélanges à composition analogue de ceux obtenus par biosynthèse il est possible d'en séparer l' α ou le β glycérophosphate ajoutés initialement ; ces sels sont à peu près purs, le β glycérophosphate ne contenant que des traces de substances oxydables par l'acide periodique ce qui prouve :

- 1) qu'il ne contient pas de glycérol ;
- 2) qu'au cours des manipulations d'isolement et purification il ne se transpose pas en α glycérophosphate.

En partant de 3 g. de l'une ou l'autre des deux formes le rendement final, soit avec la technique de KAY, soit avec notre seconde technique, oscille entre 25 et 40 p. 100.

CHAPITRE II.

ACTION SYNTHÉTISANTE DE LA PHOSPHATASE RÉNALE.

Comme source de diastase nous avons utilisé des reins de Porc frais ; ces derniers, débarrassés des particules adipeuses adhérentes, sont fendus longitudinalement, lavés au sérum physiologique stérile, broyés au hachoir universel, triturés au mortier avec le $\frac{1}{3}$ de leur poids de sable fin stérile et soumis à une autolyse de 15 jours à la température ordinaire dans cinq parties d'eau bidistillée chloroformée. L'autolysat visqueux et brunâtre est passé sur un linge fin puis filtré sur coton.

ACTION HYDROLYSANTE ET SYNTHÉTISANTE EN MILIEU GLYCÉROLÉ.

Nous avons comparé l'activité hydrolysante et synthétisante de cet autolysat réagissant sur des doses constantes de réactifs : eau, glycérol, phosphore total. La destruction de la matière organique est rendue très difficile par la forte proportion de glycérol ; nous avons évalué le pourcentage de synthèse en suivant la diminution du phosphore minéral initial.

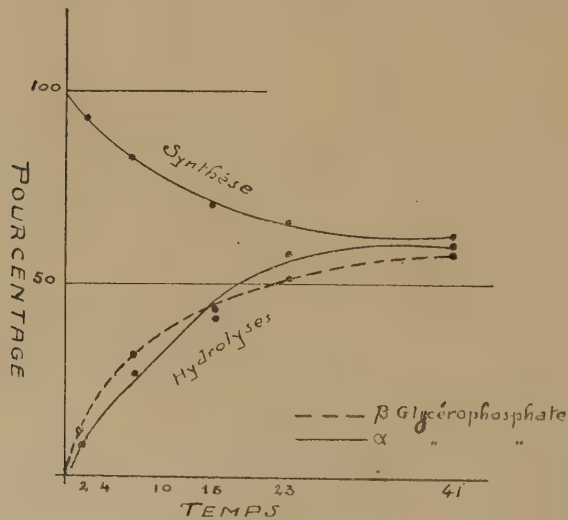
L'hydrolyse et la synthèse biochimiques conduisent au même équilibre final comme l'a signalé KAY [124]. Cet auteur a utilisé uniquement le β glycérophosphate ; nous avons observé que l' α conduit aux mêmes résultats. Nous pouvons remarquer (tableau IIL) que si la vitesse initiale d'hydrolyse du β glycérophosphate est plus grande que celle de l' α , ce dernier isomère est par contre dédoublé plus rapidement lorsque la réaction se rapproche de l'état d'équilibre, vraisemblablement par suite d'une sen-

sibilité différente à l'action inhibitrice des phosphates libérés.

TABLEAU XXXXVIII.

$\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H} + 12 \text{H}_2\text{O}$	10 g.
ou β glycérophosphate disodique hydraté.....	8 g.,54
ou α glycérophosphate disodique hydraté.....	9 g.,05
Glycérol.....	160 cm^3
Autolysat rénal.....	100 cm^3
Température 37° pH 7,3	

Temps (en jours)	Pourcentage de synthèse	Pourcentage d'hydrolyse	
		α glycérophosphate	β glycérophosphate
2	6	10	12,5
7	17	27	33
15	30	42	39
23	35	60	51
41	35	61	62



Synthèse et Hydrolyses par la
Phosphatase Rénale

COURBE 10.

D'autres autolysats moins actifs ont par contre hydrolysé l' α plus rapidement dans toutes conditions, l'état d'équilibre s'établissant plus lentement (60 jours) avec un pourcentage d'hydrolyse d'environ 70 p. 100.

Les variations de l'état d'équilibre observées avec des autolysats différents peuvent être rapportées à la plus ou moins grande concentration en colloïdes hydrophiles de ces préparations ; ces colloïdes modifient la teneur en eau libre du mélange et déplacent de ce fait l'équilibre. JACOBSON et TAPADINHAS [114] ont en effet montré qu'en présence de fumarase l'état d'équilibre fumarate -- l-malate était fonction de la teneur en eau libre du mélange.

ETUDE DES GLYCÉROPHOSPHATES ISOLÉS DES RÉACTIONS HYDROLYSANTES ET SYNTHÉTISANTES POURSUIVIES JUSQU'À OBTENTION DE L'ÉTAT D'ÉQUILIBRE.

Nous avons isolé les substances organiques phosphorées formées par biosynthèse. D'autre part nous avons cherché à connaître si, lorsque l'état d'équilibre était atteint par hydrolyse, c'est-à-dire lorsque les proportions de phosphore minéral et organique demeuraient invariables, le glycérophosphate non hydrolysé était le glycérophosphate initial et si à côté du premier équilibre glycérol + phosphate $\rightleftharpoons$ glycérophosphate ne s'établissait pas un second équilibre α glycérophosphate $\rightleftharpoons$ β glycérophosphate. Nous avons donc isolé les esters phosphoriques non dédoublés dans les réactions hydrolysantes poursuivies jusqu'à obtention de l'état d'équilibre. Nous avons utilisé des concentrations respectives en réactifs identiques à celles du tableau III. Un essai témoin avec le glycérol, le phosphate disodique et un autolysat inactivé par ébullition n'a donné lieu à aucune synthèse : la teneur en phosphore minéral reste constante et il n'est pas possible de séparer un précipité plombique contenant du phosphore organique.

Deux autres essais témoins ont été imaginés pour les réactions hydrolysantes : nous avons maintenu deux mois à 37° un mélange de glycérol 250 cm³, autolysat inactivé 150 cm³, phosphate disodique 15 g. et α ou β glycérophosphate disodique 10 g.

Les corps isolés ont été identifiés par des techniques chimiques et biochimiques.

A) *Techniques chimiques.*

Nous avons effectué les déterminations permettant :

a) de nous assurer que nous étions en présence de glycérophosphates ;

b) d'identifier soit l' α , soit le β glycérophosphate et de les doser éventuellement dans le mélange ;

c) d'identifier et de doser d'autres esters phosphoriques isolés de milieux biologiques et qui auraient pu se former au cours de la réaction diastasique par oxydation, réduction, condensation, etc.

a) IDENTIFICATION GÉNÉRALE DES GLYCÉROPHOSPHATES.

— Nous avons tout d'abord vérifié l'absence de phosphore minéral en faisant la réaction de COPAUX ; nous avons en outre vérifié que les sels isolés n'entraient pas la recherche de l'acide phosphorique par cette technique.

Nous avons poursuivi l'identification des glycérophosphates en déterminant sur une même prise d'essai :

a) l'alcalinité à l'hélianthine (par SO₄H₂ N/10) ;

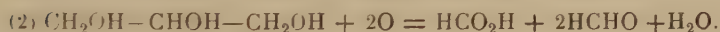
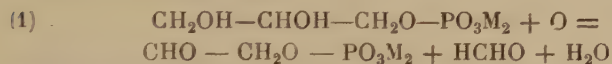
b) l'acidité à la phtaléine de la solution neutre à l'hélianthine (par HONa N/10) ;

c) le baryum (précipité sous forme de SO₄Ba) ;

d) le phosphore organique du filtrat minéralisé en présence d'acide nitrique et de nitrate de magnésie selon le protocole opératoire de P. FLEURY et SUTU [80], redissous dans l'acide nitrique dilué à chaud, reprécipité sous forme de sel ammoniaco-magnésien, isolé et dosé par la technique de COPAUX.

b) IDENTIFICATION ET DOSAGE DES α ET β GLYCÉROPHOSPHATES. — L' α glycérophosphate a été caractérisé qualitativement par la réaction colorée d'O. BAILLY [10] : la fonction alcool secondaire du sel est oxydée par l'eau de brome, l'acide dioxyacétone-phosphorique formé se condense en milieu sulfurique avec différents phénols (codéine, résorcine, thymol, acide salicylique, gaïacol) pour donner des colorations intenses et spécifiques. Nous avons suivi le protocole opératoire d'O. BAILLY qui permet d'effectuer quatre essais différents avec chacun des phénols.

L' α glycérophosphate et le glycérol sont oxydables par l'acide periodique ; les réactions peuvent être représentées par les équations 1 et 2 :



Ces équations montrent que l'oxydation d'une molécule d' α glycérophosphate exige une molécule d'acide periodique et donne naissance à deux molécules d'aldéhyde dont une de formol ; l'oxydation du glycérol exige par contre deux molécules d'acide periodique et donne naissance à deux molécules de formol. En vue de prouver l'existence d' α glycérophosphate dans nos préparations nous avons dosé :

1° les fonctions aldéhydiques libérées en nous basant sur leur action mercuro-réductrice. FLEURY et LANGE [78] ;

2° le formol selon la technique gravimétrique de ces auteurs, où l'aldéhyde formique est insolubilisé par le dimédon. P. FLEURY et ses collaborateurs ont toujours observé que cette technique fournissait des chiffres inférieurs de 10 à 15 p. 100 aux valeurs théoriques ; nous avons donc augmenté nos résultats de 10 p. 100.

Le β glycérophosphate a été recherché par la méthode de KARRER et SALOMON [122], le β glycérophosphate de baryum en solution saturée fournit avec le nitrate de

TABLEAU II.

Analyse des esters phosphoriques, les résultats sont rapportés à 1 g. de sel barytique.

	Chiffres théoriques		Glycéro-phosphate par biosyn-thèse	Résidu d'hydrolyse de l' α glycérophosphate		Résidu d'hydrolyse du β glycérophosphate	
	α glycéro-phosphate de Ba	β glycéro-phosphate de Ba		Témoin	en présence de diastase	Témoin	en présence de diastase
Alcalinité à l'hélianthine (en cm^3 de $\text{SO}_4 \text{H}_2 \text{ N}/40$)	32,57	32,57	32,2	33,45	30,8	30,7	32
Acidité à la phtaléine de la solution neutralisée à l'hélianthine (en cm^3 de $\text{NaOH N}/40$)...	32,57	32,57	32,2	32,95	31,3	28,3	32,6
Ba p. 100.....	44,62	44,62	42,65	41,65	42,9	45,3	39,6
P_2O_5 p. 100.....	23,42	23,42	23,37	24,4	23,9	23,2	24,3
Cm^3 de periodate M/20 consommés.....	65,14	0	55,1	62,2	59	6,2	33,8
Cm^3 d'aldéhydes M/20 libérés par oxydation periodique....	130,28	0	111,1	123	119,5	12,2	69
Cm^3 de formol M/20 libérés par oxydation periodique.....	65,14	0	61,5	66,4	59,5	5,4	33,8
Réaction de O. BAILLY.....	très nette	nulle	très nette	très nette	très nette	peu nette	nette
Hydrolyse par $\text{SO}_4 \text{H}_2 \text{ N}$ en 6 heures à $+100^\circ$	infime	infime	infime		infime		infime
Hydrolyse par NaOH N en 6 heures à $+100^\circ$	nulle	nulle	nulle		nulle		nulle
Phosphore minéral libre.....	néant	néant	néant	néant	néant	néant	néant
Pouvoir cupro-réducteur à chaud	0	0	infime	0	0	0	0
Pouvoir mercuro-réducteur direct à froid	0	0	infime	infime	infime	0	0
Fonctions aldéhydiques oxydables par l'hypiodite.....	0	0	infime		infime		infime

baryum un précipité peu soluble du complexe : $2 \text{PO}_4\text{Ba}$, $\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})^2 + (\text{NO}_3)^2\text{Ba}$; dans les mêmes conditions l' α glycérophosphate ne donne pas de précipité.

c) RECHERCHES DES AUTRES ESTERS PHOSPHORIQUES. — Nous avons recherché les esters phosphoriques facilement hydrolysables (pyrophosphates, hexosephosphates (1)) en dosant l'acide orthophosphorique libéré en 6 heures à 100° par l'acide sulfurique ou la soude N.

Les esters phosphoriques de polyols aldéhydiques et cétoniques (hexoses, aldéhyde glycérique, dioxyacétone) ont été recherchés en déterminant l'action réductrice :

- 1) sur la liqueur de FEHLING à chaud ;
 - 2) sur le réactif de NESSLER en 1 heure à 20° ;
- enfin en étudiant l'oxydabilité par l'hypoiodite à la glacière d'une solution privée d'alcool éthylique par deux évaporations successives au bain-marie.

Les résultats de ces diverses déterminations sont rassemblés dans le tableau IL ; chaque résultat est la moyenne de 4 à 8 dosages effectués sur des prises d'essai différentes.

RÉSULTATS DE L'ANALYSE DES ESTERS PHOSPHORIQUES.

I) Le sel obtenu par biosynthèse à la même constitution que les glycérophosphates ; il renferme au moins 80 p. 100 d' α glycérophosphate identifié par la réaction de BAILLY et évalué en dosant soit l'acide periodique réduit, soit les deux fonctions aldéhydiques, et le formol libérés par oxydation periodique. Il ne renferme que des traces infimes d'esters phosphoriques à fonction aldéhydique, cétonique, ou acide (esters des acides glycérique et pyruvique), ces derniers augmenteraient l'acidité et la teneur en baryum.

Le glycérophosphate obtenu par biosynthèse avec la phosphatase rénale se rapproche donc de celui décrit par

(1) SMYTHE [199] a décrit une combinaison équimoléculaire des esters glycérol- et glucose-phosphoriques, isolée de milieux biologiques et très difficile à diviser en ses deux constituants.

KAY [124], qui avait utilisé la phosphatase duodénale et avait caractérisé l' α glycérophosphate par son comportement vis-à-vis des phosphatases.

II) Dans les produits de la réaction d'hydrolyse du β glycérophosphate jusqu'à obtention de la réaction d'équilibre nous avons isolé un mélange d' α et β glycérophosphates. Il y a donc eu transposition du β glycérophosphate en α ; tout se passe comme si la phosphatase rénale qui synthétise préférentiellement l' α glycérophosphate hydrolysait plus fortement le β que ne l'indique le dosage du phosphore libéré, l'orthophosphate est ensuite estérifié en α glycérophosphate, cette synthèse ramenant la réaction à l'état d'équilibre. Nous avons ainsi une véritable transposition du β glycérophosphate en α . Un seul mode de transposition des β en α glycérophosphates est actuellement connu. O. BAILLY et GAUMÉ [11] ont en effet montré que par action des acides ou des alcalis sur le diester mixte méthyl- β -glycérol-phosphorique il y a libération d'alcool méthylique et formation d'un mélange d' α et β glycérophosphates ; il en est de même avec le diester méthyl- α -glycérol-phosphorique.

La transposition que nous avons observée est catalysée par la phosphatase car le témoin contient au maximum 10 p. 100 d' α glycérophosphate tandis qu'en présence de diastase active l'échantillon isolé contient environ 52 p. 100 d' α glycérophosphate identifié par la réaction de BAILLY et l'action de l'acide periodique (en dosant l'acide réduit, le formol et le bloc aldéhydique libérés).

L'ester phosphorique qui n'est pas oxydable par l'acide periodique est bien du β glycérophosphate identifié sous forme de sel de KARRER et SALOMON (K. S.) : 5 g. du sel isolé donnent 2 g.,727 de sel K. S. (théorie pour un mélange renfermant 52 p. 100 de β = 3 g.,40). L'erreur par défaut est due au fait que le sel K. S. n'est que relativement plus insoluble que les α et β glycérophosphates de Ba ; en concentrant la solution dans le vide à froid l' α glycérophosphate de Ba précipite ; le précipité de sel K. S. entraîne d'ailleurs l' α glycérophosphate : 1 g. de

sel K. S. renferme environ 10 p. 100 d' α glycérophosphate de Ba et consomme 6 cm³ d'acide periodique M/20. Ce sel K. S. contenait 48,5 p. 100 de Ba (1) (théorie 47,05). Nous avons essayé de séparer l' α glycérophosphate après élimination de la majeure partie du β sous forme de sel K. S. Le filtrat de l'opération précédente est traité par l'alcool, l'abondant précipité redissous dans le minimum d'eau distillée est porté à l'ébullition ; nous avons recueilli 1 g.,20 de sel cristallisé se comportant comme un mélange d' α et β glycérophosphates renfermant au moins 86 p. 100 d' α . Pour 1 g. de ce sel : alcalinité à l'hélianthine 31 cm³,1 de SO₄H₂ N/10, Ba p. 100 41,2, P₂O₅ p. 100 22,4, periodate M/20 réduit 55 cm³,8, aldéhydes M/20 libérés par oxydation periodique 111 cm³,7.

III) Nous pouvons donc affirmer la transposition biochimique du β glycérophosphate en α ; nous n'avons pu mettre en évidence la transposition inverse.

Le sel isolé des produits de la réaction d'hydrolyse de l' α glycérophosphate jusqu'à obtention de l'état d'équilibre est sensiblement identique à celui extrait de l'expérience témoin en présence de diastase inactivée ; il contient au moins 90 p. 100 d' α glycérophosphate caractérisé et dosé comme précédemment. Ce glycérophosphate ne donne pas le sel K. S. caractéristique du β et ne fournit la réaction colorée de BAILLY qu'après oxydation par l'eau de brome ; il ne renferme donc pas d'acide dioxycétonephosphorique.

B) Techniques biochimiques.

Pour compléter la démonstration et aussi effectuer des essais similaires à ceux de KAY, nous avons soumis à une hydrolyse diastasique les glycérophosphates obtenus par biosynthèse ou hydrolysés jusqu'à l'équilibre et des mélanges d' α et β glycérophosphates à composition voisine de celle des trois corps à analyser.

(1) Dans une tentative de séparation des α et β glycérophosphates, O. BAILLY et GAUMÉ [11] ont également précipité un sel K. S. plus riche en Ba que ne le prévoit la théorie.

TABLEAU L.

Hydrolyse biochimique des esters phosphoriques isolés.

Hydrolyse d'une quantité de P_2O_5 organique équimoléculaire à 0 g.,15 d' α -glycérophosphate de sodium cristallisé à 37° et à pH 3,7 (taka-diastase) ou 5,6 (phosphatases d'Amande) — volume total 50 cm³, tampon acide citrique-soude 10 cm³. Les chiffres indiquent le nombre de mg. de P_2O_5 libérés pendant la durée variable de la réaction.

Substrats		Dose de diastase	Taka-diastase		Emulsine Hérissé			Emulsine partiellement inactivée par l'ammoniaque 0 g.,05
			0 g.,02	0 g.,05	0 g.,02 (échantillon A)	0 g.,05 (échantillon A)	0 g.,05 (échantillon B)	
α glycéro p. 100	β glycéro p. 100	durée de la réaction (en h.)	24	5	24	7	7	72
100	0		17	8,5	16	16	10,5	12,5
90	10		18,5	12,5	15	15,5		12,5
80	20			13				13
50	50		24	14	15,5	15,5		10
0	100		28	19,5	15	15		5
Résidu d'hydrolyse de l' α glycérophosphate			16,5	8,5	16	15,5	10,5	43
Résidu d'hydrolyse du β glycérophosphate			21	12,75	14,5	15,0	10,5	11
Glycérophosphate obtenu par biosynthèse				7			10,5	13

Nous avons réalisé ces expériences avec trois phosphatases à spécificité différente : l'émulsine HÉRISSEY qui dédouble les deux isomères à des vitesses égales, la phosphatase d'Amande partiellement inactivée par l'ammoniaque H_3 qui hydrolyse l' α plus rapidement que le β et la taka-diastrase à comportement inverse. Les résultats de l'analyse biochimique (tableau L) confirment ceux de l'analyse chimique :

1) L'émulsine HÉRISSEY hydrolyse aussi rapidement les corps à analyser que les α et β glycérophosphates en solutions pures ou bien mélangées. Les trois sels à analyser se comportent donc comme des glycérophosphates vis-à-vis de cette phosphatase non spécifique.

2) Avec les deux autres diastases de spécificités différentes vis-à-vis des deux isomères, les sels obtenus par biosynthèse ou par hydrolyse de l' α glycérophosphate jusqu'à l'état d'équilibre sont hydrolysés à peu près à la même vitesse que les solutions de substrat dont le pourcentage en α glycérophosphate est de 90 ou 100. Le résidu d'hydrolyse du β glycérophosphate jusqu'à l'équilibre est dédoublé à peu près à la même vitesse qu'un mélange équi-moléculaire des deux glycérophosphates.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE II.

Nous avons pu confirmer l'action synthétisante de la phosphatase rénale réagissant sur le glycérol et le phosphate disodique. L'action hydrolysante vis-à-vis des deux glycérophosphates et l'action biosynthétisante conduisent aux mêmes états d'équilibre. Le corps obtenu par biosynthèse est constitué par au moins 80 p. 100 d' α glycérophosphate identifié par ses réactions chimiques et biochimiques. Il se rapproche donc du corps identifié biochimiquement par KAY et obtenu par action synthétisante de la phosphatase duodénale. Cette tendance de la diastase à estérifier de préférence l'une des fonctions alcool secondaire du glycérol a été confirmée indirectement :

en hydrolysant le β glycérophosphate en milieu glycérolé jusqu'à obtention de l'état d'équilibre final nous avons montré que ce corps est transposé biochimiquement en α glycérophosphate : l'isolement du glycérophosphate non hydrolysé a fourni un mélange sensiblement équimoléculaire des deux isomères. Nous avons ainsi réalisé un nouveau mode de transposition des glycérophosphates le seul actuellement connu ayant été réalisé par voie chimique par BAILLY et GARMÉ [11]. Par contre nous n'avons pu mettre en évidence le phénomène inverse : transposition de l' α glycérophosphate en β .

CHAPITRE III.

ÉTUDE DE L'ACTION SYNTHÉTISANTE DES PHOSPHATASES VÉGÉTALES.

ESSAIS GÉNÉRAUX.

Nous avons étudié l'action de préparations fermentaires d'Amande douce sur un mélange de phosphates et d'alcools ; comme alcools nous avons eu recours à l'éthanol et au glycérol.

1) L'ALCOOL ÉTHYLIQUE a été employé, parce qu'il est plus facile de caractériser le phosphore organique éventuel dans une solution alcoolique que dans une solution glycérolée ; après élimination du phosphore minéral sous forme de sel ammoniaco-magnésien (en utilisant les nitrates de magnésium et ammonium) la solution alcoolique obtenue peut être aisément minéralisée, l'acide phosphorique libéré de l'éthylphosphate éventuel est alors dosé.

Nous n'avons pu déceler de synthèse biochimique nette de cet ester ; trente-cinq expériences réalisées en faisant varier le pH, la concentration en alcool, phosphates et diastase (émulsine HÉRISSEY ou poudre d'Amande dégraissée et desséchée) n'ont pas donné de résultats encourageants. Dans les meilleures conditions le pourcentage de phosphore organique dosé n'a pas atteint plus de 3 à 4 p. 100 du phosphore total (moyenne générale 1 à 2 p. 100).

2) LE GLYCÉROL. — A la suite des expériences infructueuses avec l'alcool éthylique nous avons utilisé le glycérol, nous avons successivement étudié l'influence du

pH et de la concentration des réactifs sur la biosynthèse. En dernier lieu nous avons recherché quelle influence certains composés oxydants et réducteurs pouvaient avoir sur cette réaction de biosynthèse.

a) *Influence du pH.* — Nous avons comparé l'hydrolyse du β glycérophosphate en milieu glycérolé à la synthèse en présence de doses identiques de réactifs (diastase, phosphore total, glycérol). 5 g. de phosphate disodique à 12 H₂O ou une quantité équimoléculaire de β glycérophosphate disodique sont mis en contact avec 5 cm³ d'une solution sulfurique de titre variable, 45 cm³ d'une suspension au 1/10^e de poudre d'Amande dégraissée dans l'eau bidistillée et 80 cm³ de glycérol.

Les variations de la teneur en phosphore minéral nous ont permis de calculer les pourcentages d'hydrolyse et de synthèse qui sont rassemblés dans le tableau LI.

Nous pouvons ainsi constater que la vitesse d'hydrolyse est maxima vers pH 5,8-6,1, l'équilibre semble atteint à ces pH lorsque le pourcentage d'hydrolyse est d'environ 75 p. 100. Dans les expériences de biosynthèse les chiffres sont moins précis car ils sont calculés par différence et l'erreur absolue peut être assez élevée pour les faibles pourcentages de synthèse, nous pouvons cependant observer que de pH 5,4 à 7,7 la réaction du milieu n'a pas grande influence sur la marche de la réaction de biosynthèse, l'équilibre tendant à s'établir pour un pourcentage de synthèse d'environ 20 p. 100.

b) *Influence de la concentration des réactifs.* — A pH 6,0 environ, nous avons essayé d'augmenter le pourcentage de biosynthèse en déplaçant l'équilibre par action de masse ; nous avons donc, soit augmenté la concentration en phosphates, soit diminué celle en eau libre du milieu. Nous avons effectué ces expériences dans un but pratique : isolement de l'ester phosphorique formé ; nous avons ainsi été amené à doser la teneur en phosphore organique du précipité plombique obtenu dans la technique de KAY modifiée.

TABLEAU LI.

Action hydrolysante et synthétisante de la phosphatase d'Amande.

A) Hydolyse (pourcentage d'hydrolyse).

Temps (en jours)	pH						
	3,3	4,4	5,4	5,8	6,1	6,6	7,5
1	0	4	15	16	20	—	2
2	0	12	21	28	30	23	3
4	2	20	30	40	40	32	8
10	2	36	44	56	60	48	16
30	2	—	—	70	76	—	28
120	—	66	68	72	76	56	40
220	—	66	—	—	—	65	50

B) Synthèse (pourcentage de synthèse).

Temps (en j.)	pH							
	3,8	4,6	5,4	5,7	6,1	6,4	6,8	7,7
1	—	4	—	6	4	2	—	3
2	6	5	8	8	8	10	—	8
4	6	8	12	10	14	10	15	9
10	—	10	15	15	16	15	15	15
30	4	15	—	—	20	20	20	24
120	—	—	—	20	20	20	—	22
220	—	25	22	—	—	—	—	—

A un mélange de 80 cm³ de glycérol et 50 cm³ de suspension de poudre d'Amande dégraissée au 1/10^e nous avons ajouté 4 g. de PO₄NaH₂ + H₂O et 1 g. de PO₄Na₂H + 12 H₂O ; cette expérience nous a permis d'isoler une certaine quantité de sel plombique d'un ester phosphorique (98 mg. de P₂O₅ organique pour la totalité du

mélange réactionnel). Par contre avec des doses des deux phosphates : doubles, triples et quadruples des doses précédentes nous n'avons séparé que des traces de phosphore organique ; de fortes doses de phosphates inhibent donc la synthèse comme MAC VICAR [83] l'avait signalé avec la phosphatase rénale.

Nous avons essayé de diminuer la teneur en eau libre du milieu en remplaçant les 50 cm³ de suspension de poudre d'Amande au 1/10° par 25 cm³ de suspension au 1/5° et 25 cm³ de dioxane qui possède les propriétés dissolvantes de l'eau et des solvants organiques ; avec 80 cm³ de glycérol et les diverses doses de phosphates indiquées plus haut nous n'avons pu isoler que des traces de phosphore organique.

c) *Influence du potentiel d'oxydo-réduction.* — Des recherches récentes WALDSCHMIDT-LEITZ [209] ont montré que l'action hydrolysante ou synthétisante des diastases était réglée par le potentiel d'oxydo-réduction du milieu ; l'équilibre final serait ainsi sous la dépendance de certains systèmes oxydo-réducteurs comme les systèmes : cystéine $\rightleftharpoons$ cystine, glutathion réduit $\rightleftharpoons$ glutathion oxydé.

Un milieu réducteur augmenterait le pourcentage d'hydrolyse et un milieu oxydant celui de synthèse.

Aux proportions de réactifs nous ayant donné les meilleurs résultats en présence de phosphates (4 g. de phosphate monosodique + 1 g. de disodique) nous avons mélangé 5 cm³ d'iode N/10, l'iode est rapidement dissimulé mais inhibe la biosynthèse et nous n'avons pu isoler que des traces d'ester phosphorique.

En utilisant par contre 5 cm³ d'eau oxygénée officielle nous avons pu isoler 90 mg. de P₂O₅ organique. Par contre, en employant soit 0 g.,20 d'acide ascorbique, soit une suspension de poudre d'Amande traversée pendant dix minutes par un courant lent d'hydrogène sulfuré nous n'avons pu isoler de phosphore organique. Un certain rH₂ semble donc nécessaire pour assurer la biosynthèse.

ISOLEMENT DE L'ESTER PHOSPHORIQUE SYNTHÉTISÉ PAR LA
PHOSPHATASE D'AMANDE.

Nous avons utilisé les proportions de réactifs suivantes : glycérol : 80 cm³, suspension de poudre fermentaire : 50 cm³, PO₄NaH₂ + H₂O : 4 g., PO₄Na₂H + 12 H₂O : 1 g. Avec 16 fois ces doses, le liquide de pH 5,8 a permis d'isoler par la technique de KAY modifiée 0 g.,90 d'une poudre jaunâtre que nous avons analysée par la même technique que les préparations isolées dans l'étude de la phosphatase rénale (page 168).

a) ANALYSE CHIMIQUE. — Le corps isolé ne contient que des traces infimes d'acide orthophosphorique et ne renferme pas de substances inhibant la caractérisation de cet acide ; il contient 38 p. 100 de Ba, 17,3 p. 100 de P₂O₅, son alcalinité à l'hélianthine ramenée à 1 g. de corps correspond à 32 cm³,8 de SO₄H₂ N/10 ; l'acidité à la phtaléine de la substance neutralisée à l'hélianthine correspond à 32 cm³ de Na OH N/10. Le composé étudié ne réduit pas la liqueur de Fehling mais réduit à froid le réactif de Nessler ; cette réduction correspond à une proportion de 14 cm³ d'aldéhydes M/20 par g. de sel. En trois heures à 100° SO₄H₂ N ou NaOH N ne libèrent que des traces infinitésimales d'acide orthophosphorique.

Le corps isolé se comporte donc comme s'il contenait 75 p. 100 de glycérophosphate de baryum, les impuretés associées semblent être en majeure partie de nature protidique : pouvoir mercuro-réducteur à froid, solution aqueuse moussant abondamment par agitation et donnant un fort dégagement gazeux par l'hypobromite.

Le glycérophosphate semble être exclusivement de l'isomère α ; nous avons obtenu une réaction de Bailly très nette ; 1 g. de corps peut réduire 47 cm³,4 d'acide periodique M/20 en donnant naissance à 92 cm³ d'aldéhydes M/20 (après soustraction du pouvoir mercuro-réducteur initial) dont 46 cm³,6 de formol M/20. La réaction colorée et l'oxydation periodique confirment

donc l'existence d' α glycérophosphate qui se trouverait dans la proportion de 72 p. 100 dans le sel isolé, c'est-à-dire que tout le phosphore organique paraît être sous forme d' α glycérophosphate.

b) HYDROLYSE BIOCHIMIQUE. — A pH 4,5 et 37° la taka-diastrase libre 20 mg. de P_2O_5 à partir de 90 mg. de β glycérophosphate, 8 mg. à partir d'une quantité équimoléculaire d' α et 8 mg.,5 à partir d'une quantité équimoléculaire (en phosphore) du composé isolé. L'émulsine HÉRISSEY à pH 5,6 et 37° libre à partir de quantités égales de ces trois corps 16 mg. de P_2O_5 du composé étudié, 17 mg. de l' α glycérophosphate et 17 mg. du β .

Le corps à analyser se comporte donc comme un glycérophosphate vis-à-vis de la phosphatase non spécifique d'Amande et comme de l' α glycérophosphate vis-à-vis de la phosphatase spécifique de la taka-diastrase.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE III.

L'action synthétisante de la phosphatase d'Amande est infime en milieu éthylique ; en milieu glycérolé elle est nette de pH 5,4 à 7,7 ; de fortes doses de phosphates, SH_2 et l'acide ascorbique inhibent cette biosynthèse qui paraît être sous la dépendance du potentiel d'oxydo-réduction du milieu, un milieu oxydant favorisant la biosynthèse.

L'action synthétisante est beaucoup moins nette qu'avec la phosphatase rénale ; nous avons pu cependant isoler une petite quantité du produit synthétisé ; ce corps impur contient 75 p. 100 d'un ester phosphorique qui semble être exclusivement de l' α glycérophosphate identifié par ses caractères chimiques et son hydrolyse par deux phosphatases de spécificités différentes.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

Les résultats de notre travail peuvent être groupés en quatre chapitres distincts :

A) ACTION SUR LES α ET β GLYCÉROPHOSPHATES.

Nous nous sommes efforcé de résoudre le problème suivant : les α et β glycérophosphates sont-ils hydrolysés par des α et β glycérophosphatases différentes ou au contraire sont-ils dédoublés par une seule et même phosphatase ?

Nos résultats, obtenus avec des diastases d'origine botanique différente, sont tous en faveur de cette seconde hypothèse. Nous n'avons pas observé le moindre fait permettant d'envisager l'existence d'une α et d'une β glycérophosphatase distinctes. Nous résumerons les principaux arguments qui sont à l'appui de l'existence d'une seule glycérophosphatase.

1) Les facteurs physiques (température, pH, vieillissement, concentration saline) et les facteurs chimiques (composés chimiques divers, concentrations variables des diastases et substrats) qui modifient l'hydrolyse de l'un des glycérophosphates modifient parallèlement l'hydrolyse du second. Inversement, les facteurs sans influence sur l'hydrolyse de l'un des glycérophosphates, se montrent également sans action sur l'hydrolyse de l'autre forme.

L'étude systématique de l'affinité et de la vitesse maxima d'hydrolyse (1) de ces phosphatases végétales nous

(1) L'affinité est l'inverse de la constante de dissociation moléculaire de la combinaison diastase-substrat ou constante de MICHAELIS ; nous avons développé les caractéristiques de l'affinité dans un chapitre spécial. La vitesse maxima d'hydrolyse est la vitesse de réaction de la diastase saturée de substrat.

a révélé des particularités qui, non seulement permettent d'interpréter certaines observations sans avoir à recourir à l'hypothèse de la dualité mais encore imposent dans certains autres cas celle de l'unicité.

En effet les deux caractéristiques : affinité et vitesse maxima d'hydrolyse varient non seulement selon l'origine de la préparation diastasique, mais encore selon l'isomère hydrolysé ; dans le tableau LII nous avons résumé les variations de ces deux caractéristiques.

TABLEAU LII.

Amande.

Diastase	taka- diastase	Moutardes blancheet noire	Phosphatase normale d'Amande	Phosphatase d'Amande partiellement inactivée
Affinités vis à vis des deux isomères	$\alpha < \beta$	$\alpha = \beta$	$\alpha = \beta$	$\alpha > \beta$
Vitesses maxima d'hydrolyse des deux isomères	$\alpha < \beta$	$\alpha < \beta$	$\alpha = \beta$	$\alpha = \beta$

Leurs actions se superposent pendant l'hydrolyse, l'affinité intervient plus spécialement aux basses concentrations du substrat, tandis que la vitesse maxima intervient principalement aux fortes concentrations. Selon les conditions expérimentales l'influence de l'une des caractéristiques peut l'emporter sur celle de l'autre au cours de la réaction d'hydrolyse ; nous verrons plus loin des applications de ce principe.

3) Si au lieu d'hydrolyser séparément les deux isomères nous examinons un mélange d' α et β glycérophosphates, tout se passe comme si la diastase s'unissait aux deux isomères proportionnellement : d'une part

aux concentrations respectives des deux formes et, d'autre part, à son affinité vis-à-vis des deux isomères ; dans le cas de la taka-diastrase qui présente une plus forte affinité pour le β glycérophosphate que pour l' α , le β glycérophosphate est seul hydrolysé dans un mélange contenant 60 p. 100 ou plus de ce sel ; l' α glycérophosphate associé n'est pas modifié.

4) Nous avons étudié l'influence de divers composés chimiques sur l'affinité et la vitesse maxima d'hydrolyse des deux glycérophosphates, des expériences parallèles ont été réalisées en utilisant les phosphatases de la taka-diastrase, de la Moutarde blanche et d'Amande. D'une façon générale, pour une même diastase, les modifications, soit de l'affinité, soit de la vitesse maxima, se produisent toujours dans le même sens vis-à-vis des α et β glycérophosphates, ces modifications variant selon la préparation fermentaire.

5) Un autre argument peut être tiré de la considération d'une troisième caractéristique : le pouvoir fixateur. Ce dernier, indépendant de l'affinité et de la vitesse maxima, est identique vis-à-vis des deux glycérophosphates, ceci aussi bien en présence d'inhibiteurs (arséniates et fluorures) qu'en leur absence. Cette conclusion est basée sur le fait suivant : si on oppose à des quantités équimoléculaires et constantes d' α et β glycérophosphates des doses croissantes de diastase, la vitesse de réaction demeure à la fois maxima et constante à partir de doses égales de la même diastase (taka-diastrase). Les pouvoirs fixateurs égaux avec deux substrats différents peuvent être considérés comme une preuve de l'existence d'une seule diastase susceptible de transformer ces deux substrats.

6) Nous avons tenté de séparer les deux glycérophosphatases éventuelles ; dans ce but nous avons utilisé les principales techniques de purification et séparation des diastases pour préparer de nombreux échantillons de

phosphatase d'Amande de pureté variable. Toutes ces préparations hydrolysent à la fois l' α et le β glycérophosphate. Les préparations de grande et moyenne activité hydrolysent les deux glycérophosphates à des vitesses sensiblement égales ; les préparations partiellement inactivées hydrolysent l' α glycérophosphate plus rapidement que le β . L'étude des préparations partiellement inactivées par l'ammoniaque ou par autolyse nous a montré que ces phosphatases avaient subi une modification qui se manifeste précisément par une plus grande affinité vis-à-vis de l' α glycérophosphate que vis-à-vis du β , ce qui peut être interprété par une modification du support colloïdal ; les vitesses maxima d'hydrolyse des deux isomères demeurent par contre égales.

7) Le vieillissement, qui inactive sélectivement certaines diasases dans un mélange, est sans influence sur l'action des phosphatases vis-à-vis des glycérophosphates ; un échantillon de taka-diasase conservé depuis trente-sept ans et un d'émulsine d'Amande préparé depuis 28 ans possèdent la même spécificité envers les α et β glycérophosphates que ces préparations diastasiques fraîches.

B) CARACTÈRES COMMUNS ET DIFFÉRENTIELS
DES PHOSPHATASES ÉTUDIÉES.

En adoptant la classification de FOLLEY et KAY les phosphatases des graines rentrent dans le type A₂ (pH optimum entre 5 et 6) et la taka-diastrase appartient au groupe A₃ (pH optimum entre 3 et 5). Ces diastases possèdent quelques caractères communs et un assez grand nombre de caractères différents.

Caractères communs. — Les diastases étudiées sont insensibles à l'action de faibles doses de glycérol et d'un antiseptique : l'o-oxyquinoléine ; elles sont inhibées d'une façon concurrente par les arsénates et les phosphates.

Caractères différentiels. — Nous les avons résumés dans le tableau LIII. Nous avons d'autre part observé un certain nombre de caractères particuliers à la phosphatase d'Amande.

Nous avons tenté de purifier cette diastase par les techniques classiques, ce qui nous a permis d'observer les faits suivants :

1) La phosphatase d'Amande est facilement extractible par l'eau, adsorbable sur les adsorbants usuels (kaolin, charbon animal, alumine Cγ) ; cette adsorption croît avec l'acidité du milieu, la diastase adsorbée conserve son activité et est facilement éluée par les α et β glycérophosphates disodiques. Ces divers caractères permettent de considérer la phosphatase d'Amande comme une *lyo-phosphatase*, en adoptant la terminologie de WILLSTÄTER et ROHDEWALD.

2) Le pH optimum de 5,6-5,8 est indépendant de la nature chimique du tampon et de la plus ou moins grande activité de la préparation fermentaire.

3) La diastase inactivée pour une forte concentration en ions H ou OH, présente son maximum de stabilité vers pH 5,6.

4 Par extraction aqueuse et précipitation alcoolique ou acétonique nous avons obtenu des préparations actives : d'autres échantillons, très actifs, ont été obtenus par adsorption et élution. Ces échantillons, pauvres en protides, adsorbés et élués à nouveau, donnent des préparations peu actives, réactivables par les sels minéraux des Amandes et insensibles à l'action des sels de magnésium.

5) S'il existe un net parallélisme entre l'activité glycérophosphatasique et pyrophosphatasique des diverses préparations d'Amande : il n'y a pas de relation entre ces deux activités et leur activité β glucosidasique.

TABLEAU LIII.

Type de phosphatase	A ₂ (graines)	A ₃ (taka-diastrase)
pH optimum	5,6-5,8 indépendant de la concentration en substrat	3,9 à 5,2, varie avec la concentration du substrat
Action du fluorure de sodium	Accélère légèrement l'hydrolyse aux faibles concentrations en substrat, inhibe aux moyennes et fortes concentrations, l'action inhibitrice, croît avec la concentration du substrat	Inhibiteur concurrent, l'action inhibitrice est inversement proportionnelle à la concentration du substrat
Action du nitrate de strychnine	Légèrement activateur	Inhibiteur concurrent
Action du nitrate de magnésium	Faiblement inhibiteur	Faiblement activateur aux fortes concentrations en substrat
Action de l'Ethanol	Action inhibitrice inversement proportionnelle à la concentration du substrat	*Action inhibitrice directement proportionnelle à la concentration du substrat

C) ACTION SYNTHÉTISANTE DES PHOSPHATASES.

Certains auteurs ayant déjà réalisé la synthèse biochimique de glycérophosphates par les phosphatases du duodénum et de la taka-diastrase, nous avons essayé de l'obtenir avec les phosphatases de graines, ce qui nous a conduit à comparer l'action synthétisante d'une phosphatase animale (rein) à celle d'une phosphatase végétale (Amande).

1) L'autolysat de rein réagissant sur une solution concentrée de glycérol et phosphate disodique nous a permis d'isoler un mélange de glycérophosphates renfermant au moins 80 p. 100 d'isomère α ; ce dernier a été caractérisé : 1° en étudiant son hydrolyse par des phosphatases de spécificités différentes (méthode d'analyse utilisée par les auteurs ayant étudié les glycérophosphates obtenus par biosynthèse) ; 2° par une série de réactions chimiques spécifiques ; 3° en vérifiant l'absence d'autres esters phosphoriques isolables des tissus animaux et végétaux.

La phosphatase rénale semble estérifier de préférence la fonction alcool primaire du glycérol ; cette déduction a été confirmée indirectement par l'étude des expériences témoins d'hydrolyse. Les hydrolyses en milieu glycérolé des α et β glycérophosphates ont conduit au même état d'équilibre final que la réaction de biosynthèse ; le glycérophosphate non hydrolysé au terme de la réaction diastasique a été isolé. Nous avons constaté que le glycérophosphate isolé dans l'expérience réalisée avec l' α glycérophosphate était le sel initial ; par contre l'expérience parallèle avec le β nous a permis d'isoler un mélange de glycérophosphates renfermant environ 50 p. 100 d'isomère α , identifié chimiquement et biochimiquement comme précédemment. Nous pouvons donc admettre que la phosphatase rénale, par suite de l'estérification préférentielle d'une fonction alcool primaire, synthétise l' α glycérophosphate à partir des orthophosphates libérés

par hydrolyse de son isomère. Nous avons ainsi mis en évidence une transposition biochimique du β glycérophosphate en α , la seule transposition connue ayant été réalisée par voie purement chimique. (O. BAILLY et GAUMÉ).

2) La phosphatase d'Amande présente une faible activité synthétisante qui nous a cependant permis d'isoler un produit dont tout le phosphore organique semble être sous forme d' α glycérophosphate, identifié comme précédemment.

D) ETUDE DE L’AFFINITÉ D’UNE DIASTASE POUR SES
SUBSTRATS SPÉCIFIQUES.

Du point de vue général, nos recherches contribuent à mettre en évidence l’importance du rôle de l’« affinité » (selon MICHAELIS), dans la cinétique des réactions diastasiques. Cette notion, jointe à celle de vitesse maxima d’hydrolyse, nous a permis d’expliquer très simplement certaines particularités d’apparence paradoxale de la marche de l’hydrolyse. Nos recherches tendent à préciser ces notions. Nous avons pu observer que l’affinité des phosphatases végétales, indépendante de la concentration en diastase, varie selon l’origine de la diastase et la nature chimique du substrat ; elle croît avec l’acidité du milieu. Dans le cas de la taka-diastrase, les variations différentes de l’affinité et de la vitesse maxima d’hydrolyse en fonction du pH nous ont permis d’interpréter le déplacement du pH optimum avec la concentration du substrat. Par l’étude de l’action d’un certain nombre d’inhibiteurs sur l’affinité nous avons pu confirmer la classification de ces corps en deux groupes : les inhibiteurs absolus qui ne modifient pas l’affinité et dont l’action est de ce fait indépendante de la concentration en substrat, les inhibiteurs concurrents qui diminuent apparemment l’affinité et dont l’action est inversement proportionnelle à la concentration du substrat.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

1. ADLER (L.). — *Biochem. Z.*, 1915, **70**, 1.
2. ALBERS (H. et E.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1935, **232**, 165.
3. ALBERS (H. et E.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1935, **235**, 47.
4. AMBARD (L.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1920, **2**, 42 et 1921, **3**, 51.
- 4 bis. AMBARD (L.) et TRAUTMANN (Mlle S.). — Mécanisme des réactions fermentaires. Paris, 1937.
5. ASAKAWA (K.). — *J. Biochem. Japan*, 1928, **10**, 157.
6. ASAKAWA (K.). — *J. Biochem. Japan*, 1929, **11**, 143.
7. AUHAGEN (E.) et GRZYCKI (S.). — *Biochem. Z.*, 1933, **265**, 217.
8. BACH (D.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, **11**, 119.
9. BACH (D.). — *C. R.*, 1937, **204**, 158.
10. BAILLY (O.). — *Th. Doct. Sc.*, Paris, 1916.
11. BAILLY (O.) et GAUMÉ (J.). — *Bull. Soc. Chim. France*, 1935, **2**, 354.
12. BALLS (A. K.) et HALE (W. S.). — *J. Biol. Chem.*, 1934, **107**, 767.
13. BAMANN (E.) et DIEDERICHS (K.). — *Ber. dtsch. chem. Ges.*, 1934, **67**, 2019.
14. BAMANN (E.) et DIEDERICHS (K.). — *Ber. dtsch. chem. Ges.*, 1935, **68**, 6.
15. BAMANN (E.), MUKHERJEE (J. N.) et VOGEL (L.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1934, **229**, 15.
16. BAMANN (E.) et RENDLEN (E.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1936, **238**, 133.
17. BAMANN (E.) et RIEDEL (E.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1934, **229**, 125.
18. BAMANN (E.), RIEDEL (E.) et DIEDERICHS (K.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1934, **230**, 175.
19. BAMANN (E.) et SALZER (W.). — *Biochem. Z.*, 1936, **283**, 147.
20. BAMANN (E.) et SALZER (W.). — *Biochem. Z.*, 1936, **287**, 380.
21. BAMANN (E.) et SALZER (W.). — *Biochem. Z.*, 1936, **288**, 299.
22. BAMANN (E.), SCHWEIZER (E.) et SCHMELLER (M.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1933, **222**, 121.
23. BARENDRECHT (H. P.). — *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1920, **39**, 2.
24. BAUER (E.). — *Naturw.*, 1935, **23**, 866.
25. BAUER (E.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1936, **239**, 195.
26. BAUER (E.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1937, **243**, 213.

27. BAUER (E.), SCHÄFFNER (A.) et KRUMEY (F.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1935, **237**, 191.
28. BELFANTI (S.), CONTARDI (A.) et ERCOLI (A.). — *Biochem. J.*, 1935, **29**, 517.
29. BELFANTI (S.), CONTARDI (A.) et ERCOLI (A.). — *Biochem. J.*, 1935, **29**, 842.
30. BELFANTI (S.), CONTARDI (A.) et ERCOLI (A.). — *Biochem. J.*, 1935, **29**, 1491.
31. BERTRAND (G.). — *Revue scientifique*, 1909, **1**, 609.
32. BERTRAND (G.) et COMPTON (A.). — *Bull. Soc. Chim. France*, 1921, **29**, 229.
33. BODANSKY (O.). — *J. Biol. Chem.*, 1936, **114**, 273.
34. BODANSKY (O.). — *J. Biol. Chem.*, 1936, **115**, 101.
35. BODANSKY (O.). — *J. Biol. Chem.*, 1937, **118**, 341.
36. BRAUNSTEIN (A. E.). — *Biochem. Z.*, 1931, **240**, 68.
37. BRIDEL (M.) et DESMAREST (Mlle M.). — *J. Pharm. Chim.*, 1928, **8**, 153.
38. BRIDEL (M.) et DESMAREST (Mlle M.). — *J. Pharm. Chim.*, 1928, **8**, 201.
39. BROWN (A. J.). — *J. Chem. Soc.*, 1902, **81**, 373.
40. BROWN (H. T.) et GLENDINNING (T. A.). — *J. Chem. Soc.*, 1902, **81**, 388.
41. CATTANEO (C.), GABBRIELLI (M. C.) et SCOZ (G.). — *Enzymologia*, 1937, **2**, 17.
42. CEDRANGOLO (F.). — *Boll. soc. ital. biol. sperim.*, 1935, **10**, 374 et 1936, **11**, 140.
43. CHARPENTIER (P.) et BOUQUET (M.). — *Bull. Soc. Chim. France*, 1932, **51**, 413.
44. CHAUDUN (Mlle A.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1933, **15**, 1117.
45. CHAUDUN (Mlle A.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, n° spécial, IV^e Congrès Chim. biol., 1934, p. 287.
46. COLIN (H.) et CHAUDUN (Mlle A.). — *C. R.*, 1918, **167**, 208 et 338.
47. COLIN (H.) et CHAUDUN (Mlle A.). — *C. R.*, 1921, **172**, 278.
48. COLIN (H.) et CHAUDUN (Mlle A.). — *C. R.*, 1922, **174**, 218.
49. COLIN (H.) et CHAUDUN (Mlle A.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1923, **5**, 382.
50. CONTARDI (A.) et ERCOLI (A.). — *Biochem. Z.*, 1933, **261**, 275.
51. CONTARDI (A.), RAVAZZONI (C.) et OSELLA (L.). — *Enzymologia*, 1937, **3**, 170.
52. COPAUX (H.). — *C. R.*, 1921, **173**, 656.
53. COURTOIS (J.). — *Th. Doct. Univ. Pharm.*, Paris, 1932.
54. COURTOIS (J.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, n° spécial, IV^e Congrès Chim. biol., 1934, p. 388.
55. COURTOIS (J.). — *C. R.*, 1934, **199**, 95.
56. COURTOIS (J.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1935, **17**, 1318.
57. COURTOIS (J.). — *J. Pharm. Chim.*, 1936, **23**, 269.
58. COURTOIS (J.). — *J. Pharm. Chim.*, 1936, **23**, 404.

59. COURTOIS (J.) et DENIS (P.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1937, **19**, 496.
60. COURTOIS (J.) et TRUHAUT (R.). — *J. Pharm. Chim.*, 1937, **25**, 398.
61. DAVIES (D. R.). — *Biochem. J.*, 1934, **28**, 529.
62. DE RIENZO (A.). — *Boll. soc. ital. biol. sperim.*, 1930, **5**, 1034.
63. DE SAINT-STEBAN (G.). — *Th. Doct. Univ.-Pharm.*, Paris, 1922.
64. EADIE (G. S.). — *Biochem. J.*, 1926, **20**, 1016.
65. EHRENSVARD (G.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1933, **217**, 274.
66. EMERIQUE (Mlle L.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1935, **17**, 1372.
67. ERDTMANN (H.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1927, **172**, 182.
68. ERDTMANN (H.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1928, **177**, 231.
69. ERIKSSON (A.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1911, **72**, 313.
70. EULER (H. VON) et LAURIN (L.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1920, **110**, 55.
71. EULER (H. VON) et JOSEPHSON (K.). — *Liebigs Ann.*, 1927, **452**, 158.
72. FALKENHAUSEN (Freiherr VON). — *Biochem. Z.*, 1932, **253**, 152.
73. FERNANDEZ (O.) et PIZARROSO (A.). — *Ann. Esp. Fisica Chim.*, 1928, **26**, 118.
74. FLEURY (P.). — *Th. Pharm. Sup.*, Paris, 1920.
75. FLEURY (P.). — *Th. Doct. Sc.*, Paris, 1924.
76. FLEURY (P.) et COURTOIS (J.). — *Enzymologia*, 1937, **1**, 377.
77. FLEURY (P.) et FATOME (M.). — *J. Pharm. Chim.*, 1934, **21**, 247.
78. FLEURY (P.) et LANGE (J.). — *J. Pharm. Chim.*, 1933, **17**, 107, 196, 313 et 409.
79. FLEURY (P.) et PARIS (R.). — *J. Pharm. Chim.*, 1933, **13**, 470.
80. FLEURY (P.) et SUTU (Z.). — *J. Pharm. Chim.*, 1926, **8**, 491.
81. FLEURY (P.) et SUTU (Z.). — *Bull. Soc. Chim. France*, 1926, **39**, 1716.
82. FOLLEY (S. J.) et KAY (H. D.). — *Biochem. J.*, 1935, **29**, 1837.
83. FOLLEY (S. J.) et KAY (H. D.). — *Erg. Enzymforsch.*, 1936, **5**, 159.
84. FRANCIOLI (M.). — *Enzymologia*, 1937, **3**, 200.
85. FRANKENBURGER (W.). — *Erg. Enzymforsch.*, 1934, **3**, 1.
86. GIBAYLO (K.) et UMSCHWEIF (B.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **125**, 275.
87. GIRI (K. V.). — *Biochem. Z.*, 1936, **285**, 306.
88. GIRI (K. V.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1937, **245**, 185.
89. GIRI (K. V.) et DATTA (N. C.). — *Biochem. J.*, 1936, **30**, 1089.
90. GUALDI (A.). — *Biochem. Z.*, 1929, **205**, 320.
91. HALDANE (J. B. S.). — *Enzymes*, Londres, 1930.

92. HEDIN (S. G.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1925, **146**, 122.
93. HEDIN (S. G.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1926, **154**, 252.
94. HELFERICH (B.) et BREDERECK (H.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1930, **189**, 273.
95. HÉRISSEY (H.). — *Th. Doct. Univ. Pharm.*, Paris, 1899.
96. HERZOG (R.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1904, **41**, 416.
97. HINGLAIS (Mme H.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1927, **9**, 540.
98. HITCHCOCK (D. I.). — *J. amer. Chem. Soc.*, 1926, **48**, 2870.
99. HOLMBERG (C. G.). — *Biochem. Z.*, 1935, **279**, 145.
100. HOMMERBERG (C.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1929, **185**, 123.
101. HOMMERBERG (C.). — *Svensk. Kem. Tids.*, 1934, **47**, 63.
102. HORII (I.). — *Arb. anat. Inst. Kaiserlichen. Univ. Kyoto*, 1931, **3**, 62.
103. HUDSON (C. S.) et PARDIE (H. S.). — *J. amer. chem. Soc.*, 1909, **31**, 1242.
104. HUDSON (C. S.) et PAINE (H. S.). — *J. amer. chem. Soc.*, 1910, **32**, 985.
105. INOUE (K.). — *J. Biochem. Japan*, 1927, **7**, 433.
106. INOUE (K.). — *J. Biochem. Japan*, 1928, **10**, 133.
107. INOUE (K.). — *J. Biochem. Japan*, 1928, **10**, 395.
108. IONESCO-MATIU (A.) et POPESCO (Mme A.). — *Bull. Soc. Chim. France*, 1932, **51**, 769.
109. JACOBSEN (E.). — *Biochem. Z.*, 1932, **249**, 21.
110. JACOBSEN (E.). — *Biochem. Z.*, 1933, **263**, 302.
111. JACOBSEN (E.). — *Biochem. Z.*, 1933, **267**, 89.
112. JACOBSON (K. P.) et PEIREIRA (F. B.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934, **16**, 550.
113. JACOBSON (K. P.) et TAPADINHAS (J.). — *Biochem. Z.*, 1931, **230**, 304.
114. JACOBSON (K. P.) et TAPADINHAS (J.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934, **16**, 1637.
115. JAVILLIER (M.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, **11**, 644.
116. JAVILLIER (M.) et LAVOLLAY (J.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934, **16**, 1531.
117. JENNER (H. D.) et KAY (H. D.). — *J. Biol. Chem.*, 1931, **93**, 733.
118. JOLY (Mlle M.). — *Th. Doct. Univ. Pharm.*, Paris, 1936.
119. JOSEPHSON (K.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1924, **134**, 50.
120. JOSEPHSON (K.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1925, **147**, 1.
121. KARRER (O.) et FREULER (R.). — *Festschrift. Al. Tschirch.*, 1926, 421.
122. KARRER (P.) et SALOMON (H.). — *Helv. Chim. Acta*, 1926, **9**, 3.
123. KAY (H. D.). — *Biochem. J.*, 1926, **20**, 791.
124. KAY (H. D.). — *Biochem. J.*, 1928, **22**, 855.
125. KAY (H. D.). — *J. Chem. Soc.*, 1929, **132**, 524.
126. KAY (H.) et LEE (E.). — *J. Biol. Chem.*, 1931, **91**, 135.
127. KEILIN (D.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1936, **18**, 96.
128. KING (E. J.). — *Biochem. J.*, 1931, **25**, 799.
129. KING (E. J.) et ARMSTRONG (A. R.). — *J. Can. Med. Assoc.*, 1934, **31**, 376.

130. KITASATO (T.). — *Biochem. Z.*, 1928, **197**, 257 et **201**, 206.
131. KLEIN (W.) et ROSSI (A.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1935, **231**, 104.
132. KOBAYASHI (H.). — *J. Biochem. Japan*, 1926, **6**, 261.
133. KOBAYASHI (H.). — *J. Biochem. Japan*, 1927, **8**, 205.
134. KÖHLER (F.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1934, **223**, 98.
135. KRAUT (H.) et BARKOWSKY (F.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1933, **220**, 192.
136. KRAUT (H.) et PANTSCHENKO-JUREWICZ (W.). — *Biochem. Z.*, 1934, **275**, 114.
137. KRITSCHESKAJA (E. I.). — *Biochem. Z.*, 1934, **272**, 348.
138. KUHN (R.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1923, **125**, 28.
139. KUHN (R.) et SOBOTKA (H.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1924, **109**, 65.
140. KURATA (K.). — *J. Biochem. Japan*, 1931, **14**, 41.
141. KUROYA (M.). — *Biochem. Z.*, 1930, **225**, 452.
142. KUTSCHER (W.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1935, **235**, 62.
143. KUTSCHER (W.) et WOLBERGS (H.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1935, **236**, 237.
144. KUTSCHER (W.) et WÖRNER (A.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1936, **239**, 109.
145. LINEWEAVER (H.) et BURK (D.). — *J. amer. Chem. Soc.*, 1934, **56**, 658.
146. LOISELEUR (J.). — *C. R.*, 1937, **205**, 1103.
147. LÖVGREN (S.). — *Biochem. Z.*, 1921, **119**, 215.
148. LUNDSTEEN (E.) et VERMEHREN (E.). — *Enzymologia*, 1936, **1**, 273.
149. MAC-KENZIE (A. S.). — *Brit. Dental J.*, 1933, **54**, 153.
150. MANAKA (C.). — *J. Biochem. Japan*, 1931, **14**, 191.
151. MARTLAND (M.) et ROBISON (R.). — *Biochem. J.*, 1927, **21**, 665.
152. MEDWEDEW (G.). — *Enzymologia*, 1937, **2**, 1.
153. MICHAELIS (L.) et MENTEN (Mlle L.). — *Biochem. Z.*, 1913, **49**, 333.
154. MICHAELIS (L.) et ROTHSTEIN (M.). — *Biochem. Z.*, 1920, **110**, 217.
155. MORII (M.). — *Arb. anat. Inst. Kaiserlichen. Univ. Kyoto*, 1931, **2**, 23.
156. MORII (M.). — *Arb. anat. Inst. Kaiserlichen. Univ. Kyoto*, 1931, **3**, 33.
157. MUNEMURA (S.). — *J. Biochem. Japan*, 1933, **17**, 343.
158. MURAY (D. R.) et KING (E. J.). — *Biochem. J.*, 1930, **24**, 190.
159. MYRBÄCK (K.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1926, **158**, 160.
160. NEMEC (A.). — *Biochem. Z.*, 1919, **93**, 94.
161. NEMEC (A.). — *Biochem. Z.*, 1923, **138**, 198.
162. NEUBERG (C.) et FISCHER (H. A.). — *Enzymologia*, 1937, **2**, 191.
163. NEUBERG (C.) et FISCHER (H. A.). — *Enzymologia*, 1938, **2**, 241.
164. NEUBERG (C.) et JACOBSON (K. P.). — *Biochem. Z.*, 1928, **199**, 498.

165. NEUBERG (C.) et KARCZAG (L.). — *Biochem. Z.* 1911, **36**, 60.
166. NEUBERG (C.) et SCHUCHARDT (W.). — *Enzymologia*, 1936, **1**, 39.
167. NEUBERG (C.), WAGNER (J.) et JACOBSON (K. P.). — *Biochem. Z.*, 1927, **188**, 227.
168. NORRIS (E. R.) et RAMA RAO (A. R.). — *J. Biol. Chem.*, 1935, **103**, 783.
169. OCHIAI (E.). — *Biochem. Z.*, 1932, **253**, 185.
170. OHMORI (Y.). — *Enzymologia*, 1937, **4**, 217.
171. PARIS (R.). — *Th. Doct. Sc.*, Paris, 1935.
172. PETT (L. B.) et WYNNE (A. M.). — *Biochem. J.*, 1933, **27**, 1660.
173. PFANKUCH (E.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1936, **241**, 34.
174. PRATESI (P.). — *Enzymologia*, 1937, **4**, 242.
175. PRINGSHEIM (H.) et LOEW (F.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1935, **17**, 1607.
176. PRUNIER (G.). — *Th. Doct. Univ. Pharm.*, Paris, 1907.
177. RAE (J. J.). — *Biochem. J.*, 1934, **28**, 152.
178. RAE (J. J.), KAY (H. D.) et KING (E. J.). — *Biochem. J.*, 1934, **28**, 143.
179. REIS (J.). — *Enzymologia*, 1937, **2**, 110.
180. REIS (J.). — *Enzymologia*, 1937, **2**, 183.
181. ROBISON (R.) et ROSENHEIM (A. H.). — *Biochem. J.*, 1934, **28**, 684.
182. ROCHE (J.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1931, **13**, 841.
183. ROCHE (J.), FILIPPI (Mme A.) et LEANDRI (Mme A.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1937, **19**, 1314.
184. ROCHE (J.) et LATREILLE (Mlle M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **116**, 1033.
185. ROCHE (J.) et LATREILLE (Mlle M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **119**, 1144.
186. ROCHE (J.) et LATREILLE (Mlle M.). — *Enzymologia*, 1937, **3**, 75.
187. RONA (P.) et AMMON (R.). — *Erg. Enzymforsch.*, 1933, **2**, 50.
188. ROSSI (A.). — *Boll. soc. ital. biol. sperim.*, 1933, **8**, 714.
189. SCHÄFFNER (A.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1937, **248**, 159.
190. SCHÄFFNER (A.) et BAUER (E.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1934, **225**, 245.
191. SCHÄFFNER (A.) et BAUER (E.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1935, **232**, 64, 66.
192. SCHÄFFNER (A.), BAUER (E.) et KRUMEY (F.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1936, **243**, 149.
193. SCHOONOVER (J. W.). — *Biochem. J.*, 1936, **30**, 1097.
194. SCHUCHARDT (W.). — *Biochem. Z.*, 1935, **278**, 164.
195. SCHUCHARDT (W.). — *Biochem. Z.*, 1936, **283**, 433.
196. SCHUCHARDT (W.). — *Biochem. Z.*, 1936, **285**, 448.
197. SCHWAB (G. M.), BAMANN (E.) et LAEVERENZ (P.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1933, **215**, 121.
198. SCOZ (G.), CATTANEO (C.) et GABRIELLI (M. C.). — *Enzymologia*, 1937, **3**, 29.

199. SMYTHE (C. V.). — *J. Biol. Chem.*, 1937, **117**, 135.
 200. SOBOTKA (H.) et GLICK (D.). — *J. Biol. Chem.*, 1934, **105**, 199.
 201. STERN (K. G.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1932, **209**, 176.
 202. STERN (K. G.). — *J. Biol. Chem.*, 1936, **114**, 473.
 203. SULLIVAN (C.) et TOMPSON (M. V.). — *J. Chem. Soc.*, 1890, **57**, 834.
 204. SUZUKI (B.) et MARUYAMA (T.). — *Proceed. Imp. Acad. Tokyo*, 1930, **6**, 67.
 205. THANNHAUSER (S. J.), REICHEL (M.), GRATTAN (J. F.) et MADDOCK (S. J.). — *J. Biol. Chem.*, 1937, **121**, 697, 709, 715, 721 et 727.
 206. THUNBERG (T.). — *Skand. Arch. Physiol.*, 1936, **75**, 199.
 207. UZAWA (S.). — *J. Biochem. Japan*, 1932, **15**, 1, 11 et 19.
 208. WALDSCHMIDT-LEITZ (E.) et MAYER (K.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1935, **236**, 168.
 209. WALDSCHMIDT-LEITZ (E.). — *J. Soc. Chim. Ind.*, 1936, **55**, 620.
 210. WEBER (H.) et AMMON (R.). — *Biochem. Z.*, 1929, **204**, 197.
 211. WESTENBRINCK (H. G. K.). — *Arch. neerl. Physiol.*, 1935, **20**, 566.
 212. WILLSTÄTTER (R.). — *Ber. dtsh. chem. Ges.*, 1922, **55**, 3601.
 213. WILLSTÄTTER (R.) et CSANYI (W.). — *Z. Physiol. Chem.*, 221, **117**, 172.
 214. WILLSTÄTTER (R.) et KUHN (R.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1923, **129**, 33.
 215. WILLSTÄTTER (R.), KUHN (R.) et BAMANN (E.). — *Ber. dtsh. Chem. Ges.*, 1928, **61**, 886.
 216. WILLSTÄTTER (R.), KUHN (R.) et SOBOTKA (H.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1924, **134**, 224.
 217. WILLSTÄTTER (R.) et MEMMEN (F.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1924, **138**, 216.
 218. WILLSTÄTTER (R.) et ROHDEWALD (M.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1931, **203**, 189.
 219. WILLSTÄTTER (R.) et SCHNEIDER (K.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1925, **142**, 257.
 220. WILLSTÄTTER (R.) et SOBOTKA (H.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1922, **123**, 170.
 221. WURTZ (A.). — *C. R.*, 1880, **91**, 787.
 222. YAMANE (T.). — *Arb. anat. Inst. Kaiserlichen Univ. Kyoto*, 1932, **3**, 35.
 223. ZEILE (K.) et HELLSTRÖM (H.). — *Z. Physiol. Chem.*, 1930, **192**, 171.
-

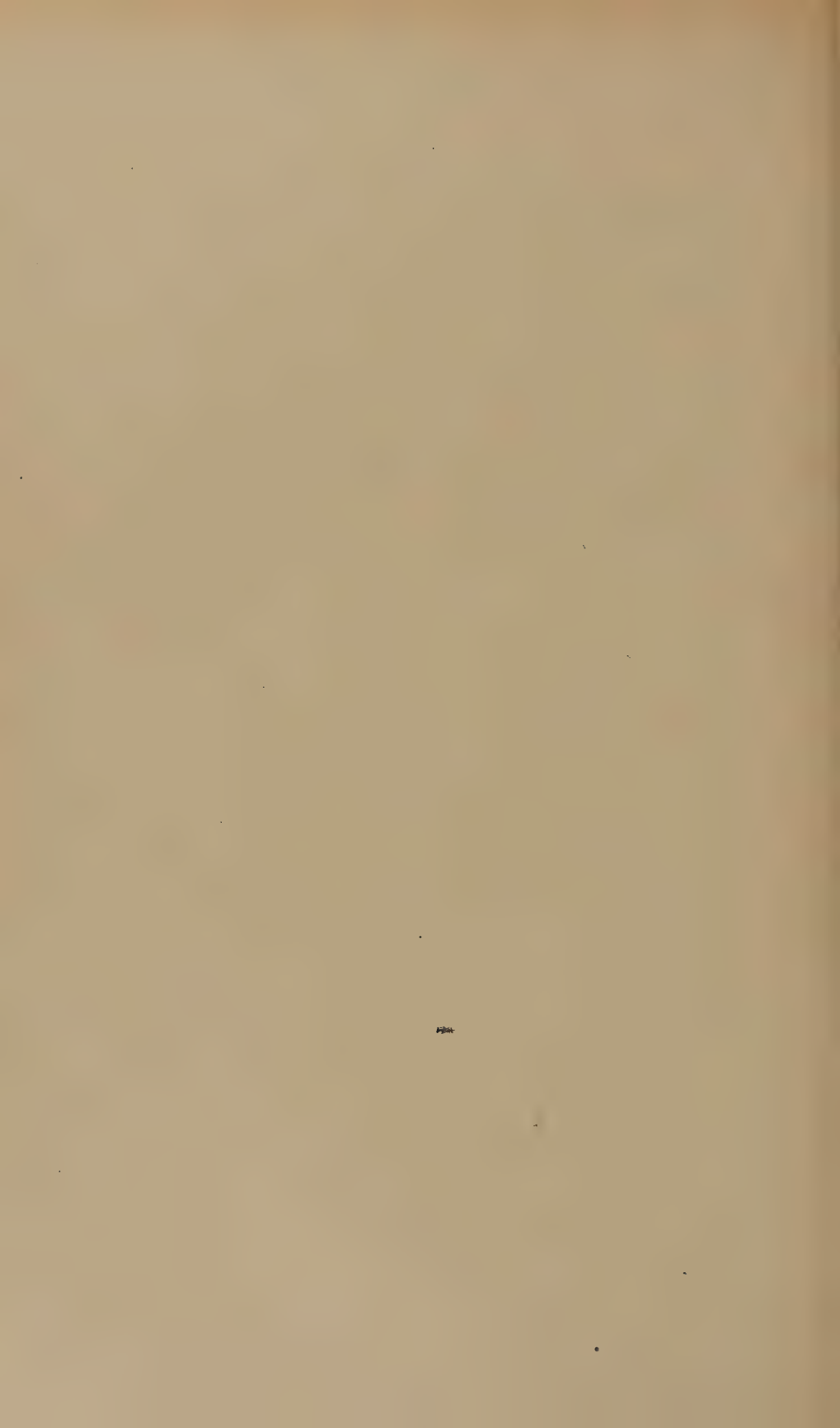


TABLE DES MATIERES.

Pages

PREMIÈRE PARTIE.

Généralités	
CHAPITRE I. — <i>Les phosphatases</i>	9
<i>Répartition des phosphatases</i>	9
<i>Classification des phosphatases</i>	10
<i>Les phosphomonoestérases. — Champ d'action</i> ..	13
<i>Classification des phosphomonoestérases</i>	14
A) pH optimum	14
B) Inactivation des phosphatases en fonction du pH	15
C) Purification des phosphatases	16
D) Action de divers composés chimiques sur les phosphatases	17
I) Inhibiteurs généraux	17
II) Inhibiteurs spécifiques	19
III) Activateurs spécifiques	20
E) Action des phosphatases sur les α et β gly- cérophosphates	23
1) Action des réactifs chimiques	23
2) Action des phosphatases	23
F) Action synthétisante des phosphatases	27
CHAPITRE II. — <i>La combinaison diastase-substrat</i>	
Introduction	29
Preuves en faveur de l'existence d'une combi- naison diastase-substrat	29

Propriétés de la combinaison diastase-substrat	32
La dissociation de la combinaison diastase-substrat	32
Influence de différents facteurs sur la stabilité de la combinaison diastase-substrat..	36
a) Facteurs ne modifiant pas l'affinité..	37
b) Facteurs modifiant l'affinité.....	38
Affinité et pouvoir fixateur	42
Affinité et vitesse maxima d'hydrolyse..	42
Relations entre l'affinité et la nature de la combinaison diastase-substrat	45
Constitution des diastases	45
Théorie de la double affinité	46
Conclusions du Chapitre II.....	48
 CHAPITRE III. — <i>Techniques analytiques</i>	 50
Protocole général des expériences d'hydrolyse	50
Dosage de l'acide orthophosphorique.....	51
Dosage du glycérol	53

DEUXIÈME PARTIE.

Étude de la taka-diastase	
Introduction	55
I. <i>Influence de la durée de la réaction sur l'hydrolyse des deux glycérophosphates</i>	57
II. <i>Influence de la concentration du substrat sur le pH optimum d'hydrolyse</i>	59
Exposé des résultats	61
Interprétation des résultats	61
III. <i>Détermination à différents pH de l'affinité et de la vitesse maxima d'hydrolyse des deux glycérophosphates</i>	62
Protocole expérimental	62
Interprétation des résultats	66
a) Variations du pH optimum	69

Extension de cette interprétation à d'autres diastases	70
β) Mécanisme d'action de la diastase....	70
γ) Action simultanée sur les deux isomères	71
IV. <i>Influence de doses variables de diastase sur une dose constante de substrat</i>	73
Protocole expérimental	74
Discussion des résultats	74
V. <i>Action des divers composés chimiques sur l'hydrolyse des glycérophosphates par la taka-diastase</i>	77
A) Action de doses variables de différents corps sur des doses constantes de taka-diastase et glycérophosphates	77
B) Mesure de l'affinité de la taka-diastase en présence de divers composés chimiques	81
C) Influence des arsénates et des fluorures sur le pouvoir fixateur de la taka-diastase	87
VI. <i>Action du vieillissement sur l'activité d'une préparation de taka-diastase</i>	90
<i>Conclusions générales de la deuxième partie</i>	93

TROISIÈME PARTIE.

Étude des phosphatases de graines	95
CHAPITRE I. — <i>Etude des phosphatases de graines dédoublant le β glycérophosphate plus rapidement que l'α.</i>	96
A) Influence de la durée d'hydrolyse à diverses températures	96
B) Influence du pH sur l'activité pour diverses concentrations du substrat....	101
C) Affinité de la phosphatase de Moutarde blanche vis à vis des glycérophosphates	103
D) Action des phosphatases de graines sur un mélange de glycérophosphates	105

E) Influence de divers composés chimiques sur l'hydrolyse des deux glycérophosphates	107
1) Action de doses variables de divers composés chimiques sur la phosphatase de Moutarde blanche....	107
2) Action de doses constantes de divers composés chimiques sur l'affinité de la phosphatase de Moutarde blanche	107
 CHAPITRE II. — <i>Etude des phosphatases de graines hydrolysant les deux glycérophosphates à des vitesses sensiblement identiques</i>	
A) Influence de la durée d'hydrolyse à diverses températures	113
B) Influence du tampon sur le pH optimum de l'émulsine	116
C) Inactivation de la phosphatase d'Amande en fonction du pH	118
D) Affinité de la phosphatase d'Amande pour les glycérophosphates	119
E) Action de différents composés chimiques.	122
1) Action de doses variables de divers composés chimiques	122
2) Action de divers composés chimiques sur l'affinité de la phosphatase d'Amande	126
Conclusions du Chapitre II.....	128
 CHAPITRE III. — <i>Action de préparations d'Amande douce de pureté variable sur les glycérophosphates</i>	
I. <i>Préparations fermentaires obtenues par extraction à différents pH et précipitation</i> ..	130
A) Technique de préparation des divers échantillons	131
a) Extraction par l'eau distillée	131
b) Extraction en milieu acide	133
c) Extraction en milieu alcalin	134
B) Mesure de l'activité de ces diverses préparations fermentaires	136
C) Discussion des résultats expérimentaux...	140

1) Activité phosphatasique générale	140
2) Activité phosphatasique et β glucosidase	142
3) Action sur les α et β glycérophosphates	142
a) Action de la phosphatase obtenue en milieu ammoniacal sur l'émulsine	143
b) Activité en fonction du pH	146
c) Mesure de l'affinité de ces phosphatases	146
II. <i>Préparations fermentaires obtenues en utilisant les techniques d'adsorption</i>	147
A) Essais d'adsorption à différents pH.....	148
B) Essais d'élution spécifique	150
C) Recherches en vue d'améliorer la purification	153
III. <i>Purification par préadsorption</i>	154
Conclusions du Chapitre III	157

QUATRIÈME PARTIE.

Recherches sur la synthèse biochimique des glycérophosphates	159
---	-----

CHAPITRE I. — <i>Isolement des glycérophosphates à partir du mélange réactionnel</i>	160
--	-----

1) Elimination du phosphore minéral	160
2) Précipitation du phosphore organique....	162
3) Purification du précipité d'esters phosphoriques	164

CHAPITRE II. — <i>Action synthétisante de la phosphatase rénale</i>	165
---	-----

Action hydrolysante et synthétisante en milieu glycérolé	165
--	-----

Etude des glycérophosphates isolés des réactions hydrolysantes et synthétisantes poursuivies jusqu'à obtention de l'état d'équilibre	167
--	-----

A) Techniques chimiques	168
B) Techniques biochimiques	173
Conclusions du Chapitre II	175
CHAPITRE III. — <i>Etude de l'action synthétisante des phosphatases végétales</i>	177
Essais généraux	177
Isolement de l'ester phosphorique synthétisé par la phosphatase d'Amande	181
Conclusions du Chapitre III.....	182
<i>Conclusions générales</i>	183
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	193

DEUXIÈME THÈSE.

Propositions données par la Faculté :

**RÉACTIONS DIASTASIQUES
ET RÉACTIONS EN CHAÎNES**

Vu et approuvé :

Paris, le 9 Juin 1938.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Ch. MAURAIN.

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris.

G. ROUSSY.

IMPRIMERIE M. DECLUME
LONS-LE-SAUNIER.

